

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,
Molekulare Diagnostik

Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH, Standort Marburg

**Untersuchung der Rolle von Neurotrophen in
der Zellphysiologie von Atemwegsepithelzellen
am Beispiel der murinen Lungenepithelzelllinie
LA-4**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ariyan Pirayesh Islamian

aus Tabriz

Marburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 3. Februar 2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

| | |
|--------------|-----------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. M. Rothmund |
| Referent: | PD Dr. A. Nockher |
| Korreferent: | Prof. Dr. N. Decher |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------|--|-----------------|
| I | Abkürzungsverzeichnis..... | 6 |
| 1 | <u>Einleitung.....</u> | <u>7</u> |
| 1.1 | Neurotrophine..... | 8 |
| 1.1.1 | Struktur der Neurotrophin-Gene..... | 8 |
| 1.1.2 | Molekulare Regulationsmechanismen der Transkription von Neurotrophin-Genen..... | 9 |
| 1.1.3 | Proteinprozessierung und Sekretion..... | 9 |
| 1.1.4 | Rezeptoren der Neurotrophine..... | 11 |
| 1.1.4.1 | <i>trk-Rezeptoren</i> | 13 |
| 1.1.4.1.1 | Struktur der trk-Rezeptor-Gene und molekulare Mechanismen der Regulation ihrer Transkription..... | 13 |
| 1.1.4.1.2 | Struktur der trk-Rezeptoren..... | 13 |
| 1.1.4.1.2.1 | gp145trkB und gp95trkB..... | 14 |
| 1.1.4.2 | <i>p75NTR</i> | 16 |
| 1.1.4.2.1 | Struktur des p75-Neurotrophinrezeptorgens und molekulare Mechanismen der Regulation seiner Transkription..... | 16 |
| 1.1.4.2.2 | Struktur des p75NTR..... | 16 |
| 1.1.4.3 | <i>Signaltransduktion über Neurotrophinrezeptoren</i> | 17 |
| 1.1.4.3.1 | Signaltransduktion über trk-Rezeptoren..... | 17 |
| 1.1.4.3.1.1 | Ras Signalweg..... | 18 |
| 1.1.4.3.1.2 | PI3K Signalweg..... | 19 |
| 1.1.4.3.1.3 | PLC- γ 1 Signalweg..... | 20 |
| 1.1.4.3.1.4 | Regulation der Signaltransduktionswege durch transmembranären Transport des Neurotrophin-trk-Rezeptor-Komplexes..... | 21 |
| 1.1.4.3.1.5 | Transaktivierung von trk-Rezeptoren..... | 21 |
| 1.1.4.3.2 | Signaltransduktion über p75NTR..... | 22 |
| 1.1.4.3.2.1 | Interaktion von Pro-Neurotrophinen mit p75NTR..... | 23 |
| 1.2 | Physiologische Neurotrophinexpression in der Lunge..... | 24 |
| 1.2.1 | Neurotrophine und Innervation der Lunge..... | 24 |
| 1.2.2 | Neurotrophine und nicht-neuronaales Lungengewebe..... | 25 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.3 | Rolle der Neurotrophine in entzündlichen Lungen- erkrankungen..... | 26 |
| 1.3.1 | Allergisches Asthma bronchiale..... | 27 |
| 1.3.1.1 | Innervation der Lunge und das Konzept der neurogenen Entzündung..... | 28 |
| 1.3.1.2 | Neurotrophine und neuronale Plastizität..... | 31 |
| 1.3.1.3 | Wirkung der Neurotrophine im Immunsystem..... | 32 |
| 1.4 | Lungenepithelzellen..... | 34 |
| 1.4.1 | Rolle des Lungenepithels in der Pathogenese des allergischen Asthmas..... | 35 |
| 1.4.1.1 | Reparaturmechanismus des Lungenepithels im Rahmen des allergischen Asthmas..... | 37 |
| 2 | <u>Ziel der Untersuchungen.....</u> | 41 |
| 3 | <u>Materialien.....</u> | 43 |
| 3.1 | Chemikalien, Puffer und Lösungen..... | 43 |
| 3.1.1 | Bestandteile des Kulturmediums..... | 43 |
| 3.1.2 | Sonstige Lösungen..... | 43 |
| 3.1.3 | Zytokine..... | 43 |
| 3.1.4 | Neurotrophine..... | 44 |
| 3.1.5 | Antikörper..... | 44 |
| 3.1.6 | Oligonukleotide..... | 44 |
| 3.2 | Kits und Assaysysteme..... | 45 |
| 3.3 | Gefäße und Verbrauchsmaterial..... | 45 |
| 3.4 | Geräte..... | 46 |
| 3.5 | Zelllinie..... | 46 |
| 4 | <u>Methoden.....</u> | 47 |
| 4.1 | Zellkultur..... | 47 |
| 4.1.1 | Kultivierung der LA-4 Zellen..... | 47 |
| 4.2 | Quantitative Proteinbestimmung mittels ELISA..... | 48 |
| 4.3 | Proliferationsmessungen..... | 49 |
| 4.3.1 | CellTiter 96®Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay..... | 49 |
| 4.3.2 | BrdU Cell Proliferation ELISA..... | 49 |
| 4.4 | Molekularbiologische Untersuchungen..... | 50 |
| 4.4.1 | RNA-Isolierung..... | 50 |
| 4.4.2 | Quantifizierung der RNA..... | 51 |
| 4.4.3 | DNA-Digestion..... | 51 |
| 4.4.4 | Reverse Transkription..... | 52 |
| 4.4.5 | Polymerase-Ketten-Reaktion..... | 53 |
| 4.4.6 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 54 |
| 4.5 | Statistik..... | 54 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5 | <u>Ergebnisse</u> | 55 |
| 5.1 | Sekretionsprofil von Neurotrophen unter basalen Bedingungen... | 55 |
| 5.2 | Polarisierte Sekretion von NGF und BDNF..... | 57 |
| 5.3 | Wachstumskinetik der LA-4 Zellen..... | 59 |
| 5.4 | Abhängigkeit des Sekretionsverhaltens für NGF und BDNF von der jeweiligen Wachstumsphase der Zellpopulation..... | 60 |
| 5.5 | Expression von Neurotrophin-Rezeptoren-mRNA in Abhängigkeit vom Konfluenzgrad der Zellpopulation..... | 62 |
| 5.6 | Einfluss der Neurotrophine auf die Zellproliferation..... | 64 |
| 5.6.1 | Proliferation unter Inhibition der trk-Rezeptoren durch K252a..... | 64 |
| 5.6.2 | Proliferation unter Stimulation mit Neurotrophen..... | 67 |
| 5.6.2.1 | Proliferationsmessung unter Stimulation mit Neurotrophen anhand des CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assays..... | 67 |
| 5.6.2.2 | Proliferationsmessung unter Stimulation mit Neurotrophen anhand des BrdU Cell Proliferation ELISAs..... | 68 |
| 5.6.3 | Proliferation von LA-4 Zellen in Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern gegen NGF bzw. BDNF..... | 71 |
| 5.7 | Einfluss verschiedener Zytokine auf die Sekretion von NGF und BDNF..... | 73 |
| 5.8 | Einfluss von Dexamethason auf die Sekretion von NGF und BDNF..... | 76 |
| 6 | <u>Diskussion</u> | 78 |
| 6.1 | Sekretion von NGF und BDNF unter basalen Bedingungen..... | 78 |
| 6.2 | Sekretion von NGF und BDNF unter pro- und anti- inflammatorischen Bedingungen..... | 80 |
| 6.3 | Einfluss des NGF und BDNF auf das Proliferationsverhalten von Lungenepithelzellen..... | 82 |
| 7 | <u>Zusammenfassung</u> | 84 |
| 8 | <u>Literaturverzeichnis</u> | 87 |
| 9 | <u>Anhang</u> | 108 |
| | Abbildungsverzeichnis..... | 108 |
| | Anmerkung..... | 109 |
| | Verzeichnis der akademischen Lehrer..... | 110 |
| | Danksagung..... | 111 |

I Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| <i>Akt</i> | serine/threonine kinase |
| <i>BAD</i> | Bcl-2/Bcl-x associated death promoter |
| <i>BDNF</i> | brain-derived neurotrophic factor |
| <i>BrdU</i> | bromodeoxyuridine |
| <i>CREB</i> | cAMP response element binding protein |
| <i>DAG</i> | diacylglycerol |
| <i>ECM</i> | extracellular matrix |
| <i>ELISA</i> | enzym-linked immunosorbent assay |
| <i>ERK</i> | extracellular signal regulated kinase |
| <i>EPX</i> | eosinophilic protein X |
| <i>FKHRL1</i> | forkhead transcription factor |
| <i>FCS</i> | fetal calf serum |
| <i>FGF</i> | fibroblast growth factor |
| <i>FRS</i> | fibroblast growth factor receptor substrate |
| <i>GM-CSF</i> | granulocyte/macrophage-colony stimulating factor |
| <i>GPCR</i> | G-protein-coupled receptors |
| <i>GSK</i> | glykogen-synthase-kinase |
| <i>HGF</i> | hepatocyte growth factor |
| <i>ICAM</i> | intracellular adhesion molecule |
| <i>IgE</i> | immunglobuline E |
| <i>IP3</i> | inositol-1,4,5-triphosphate |
| <i>JNK</i> | c-Jun N-terminal kinase |
| <i>KGF/FGF-7</i> | keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7 |
| <i>LFA</i> | lymphocyte function-associated antigen |
| <i>MAPK</i> | mitogen-activated protein kinase |
| <i>MCP-1</i> | monocyte chemoattractant protein-1 |
| <i>mRNA</i> | messenger ribonucleic acid |
| <i>NANC</i> | nonadrenergic-noncholinergic |
| <i>NF-κB</i> | nuclear factor κB |
| <i>NGF</i> | nerve growth factor |
| <i>NT</i> | neurotrophin(s) |
| <i>NTR</i> | neurotrophin receptor(s) |
| <i>ntR</i> | non translated region |
| <i>PACAP</i> | pituitary adenylat cyclase-activating polypeptide |
| <i>PCNA</i> | proliferating cell nuclear antigen |
| <i>PCR</i> | polymerase chain reaction |
| <i>PDK</i> | phosphoinositide-dependent kinase |
| <i>PKC</i> | protein kinase C |
| <i>PI3K</i> | phosphoinositide 3 kinase |
| <i>PIP2</i> | phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate |
| <i>PLC-γ1</i> | phospholipase C-γ1 |
| <i>p-Rb</i> | hyperphosphorylated retinoblastoma-protein |
| <i>RNA</i> | ribonucleic acid |
| <i>RT-PCR</i> | reverse transcription polymerase chain reaction |
| <i>Shc</i> | Src homologous and collagen-like adaptor protein |
| <i>SH-PTP</i> | Src homology protein tyrosine phosphatase |
| <i>SOS</i> | Ras exchange factor son of sevenless |
| <i>TGF-β</i> | transforming growth factor β |
| <i>TH2</i> | type 2 T-helper cell |
| <i>TNF</i> | tumor necrosis factor |
| <i>trk</i> | tropomyosin-related-kinase |
| <i>VIP</i> | vasoactive intestinal peptide |

1 EINLEITUNG

Mitte des letzten Jahrhunderts konnten *Levi-Montalcini et al.* im Rahmen einer neuroembryologischen Versuchsreihe an Mäusen beobachten, dass nach intraembryonaler Transplantation von Teilen eines Sarkoms, ein stark hyperplastisches Wachstum von sowohl sensorischen als auch sympathischen Ganglien - unabhängig von ihrer lokalen Beziehung zum neoplastischen Gewebe - einsetzte [¹⁰⁷].

Diese Beobachtung markiert die Geburtsstunde intensiver Forschungsbemühungen zum Nachweis der Existenz spezieller Moleküle, die von Gewebe zwecks Unterstützung der sie innervierenden Nervenzellen im Sinne von Wachstums- und Überlebensfaktoren sezerniert werden.

Mit der Entdeckung des *nerve growth factor* (NGF) erfolgte der Nachweis des ersten Vertreters der heute als Gruppe der *klassischen* Neurotrophine zusammengefassten Wachstumsfaktoren. Mittlerweile umfasst diese Gruppe neben dem NGF noch drei weitere Proteine: *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *neurotrophin-3* (NT-3) sowie *neurotrophin-4/5* (NT-4/5), die alle einen hohen Grad an genomischer, struktureller und funktioneller Homologie untereinander sowie zwischen den verschiedenen Säugetierspezies aufweisen [¹⁶⁹].

Obwohl sie ihren Namen von der initial nachgewiesenen, essentiellen Wirkung des NGF auf das Wachstum, Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen, die aus der Neuralleiste abstammenden, zu verdanken haben, musste man in Zusammenhang mit den wachsenden Erkenntnissen der letzten Jahre über die Expression von Neurotrophinen außerhalb des Nervensystems, wie z. B. in Immunzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, und endokrinen Zellen, das anfänglich erstellte Postulat von der Aktivität der Neurotrophine als gewebspezifische Signalmoleküle revidieren, so dass mittlerweile nunmehr von einer Gruppe von multifunktionellen Signalmolekülen ausgegangen werden darf, die ihre Wirkung in verschiedenen Geweben entfalten [¹³⁴].

In Anbetracht ihrer wichtigen Funktion in der Immunregulation wird ihnen besonders im Rahmen allergisch-entzündlicher Erkrankungen, wie z. B. dem allergischen Asthma bronchiale, eine große Bedeutung eingeräumt, da hierbei neben einer

immunologischen Dysregulation vermutlich eine komplexe neuro-immunologische Wechselwirkung der Pathogenese zugrunde liegt [¹³³].

1. 1 Neurotrophine

1. 1. 1 Struktur der Neurotrophin-Gene

Allen Genen der klassischen Neurotrophinfamilie ist eine grundlegend gleiche Struktur eigen, bei der ein einziges, diskontinuierliches Exon sämtliche Informationen zur Kodierung eines Prä-Propeptides beinhaltet. Dieses Exon befindet sich im Anschluss an eine Reihe von nichtkodierenden Exons, die Gegenstand von alternativem Splicing sind und zu einer Bandbreite von mRNAs mit unterschiedlichen nichttranslatierten Regionen (ntR) am 5'-Ende führen. Zudem existieren für alle Neurotrophine multiple Promotor-Regionen, die den unterschiedlichen vorgeschalteten Exons angrenzen und somit zu einem komplexen Muster von mRNAs beitragen. Aufgrund des begrenzten Wissens über die verschiedenen nichtkodierenden Exons der Neurotrophin-Gene und die multiplen Promotor-Regionen, ist derzeit nicht ganz klar, warum identische Neurotrophine durch verschiedene mRNAs mit unterschiedlichen 5'-ntRs kodiert werden und warum ein Neurotrophin-Gen verschiedene Arten von mRNAs generiert.

Als Erklärungsansatz könnten die Ergebnisse aus Untersuchungen an Nervenzellen herangezogen werden, die für das BDNF-kodierende Gen aufzeigen konnten, dass die verschiedenen Promotor-Regionen im Laufe der Embryonalentwicklung einem unterschiedlichen Regulationsmuster unterliegen [¹⁸⁸] und die Aktivierung verschiedener Subtypen von Glutamatrezeptoren die Expression jeweils unterschiedlicher, Exon-spezifischer mRNAs für BDNF reguliert [^{3, 120}].

Letztlich ist davon auszugehen, dass die unterschiedlichen 5'-ntR-Nebenprodukte nicht nur das Ergebnis einer spezifischen Nutzung der Promotor-Regionen darstellen, sondern auch eine Funktion in der Stabilisation der mRNA ausüben und an der

Regulation der Translation in gewebsspezifischer und dem jeweiligen Stadium der Ontogenese entsprechender Weise beteiligt sind [¹¹⁹].

1. 1. 2 Molekulare Regulationsmechanismen der Transkription von Neurotrophin-Genen

Das Wissen um molekulare Mechanismen der Regulation der Transkription von Neurotrophin-Genen ist nur bruchstückhaft und beschränkt sich hauptsächlich auf Erkenntnisse über die Regulation der Transkription des NGF- und BDNF-Gens. So konnte beispielsweise für die Expression des NGF-Gens nachgewiesen werden, dass sie über eine Interaktion des Transkriptionsfaktors c-fos mit der Aktivator Protein (AP)-1 Region im ersten Intron des NGF-Gens vermittelt wird [^{74, 141}].

Die Regulation der Transkription des BDNF-Gens hingegen beruht u. a. auf eine zell-spezifische Aktivierung von unterschiedlichen Promotor-Regionen als Antwort auf Vorgänge, die mit einem Ca^{2+} -Einstrom innerhalb der Zelle einhergehen und an denen spezifische Ca^{2+} /Calmodulin-Kinasen beteiligt sind [^{150, 182}].

1. 1. 3 Proteinprozessierung und Sekretion

Nach Abschluß der Translation liegen die Neurotrophine zunächst als Precursor-Proteine bzw. Pro-Neurotrophine mit einer Masse von 30-35 kDa vor, deren N-terminale Hälfte eine essentielle Rolle bei der Einbindung der Proteine an den Sekretionsvorgang zugeschrieben wird. Diese sog. Pro-Domäne beinhaltet zudem die dibasische Spaltungsregion, an der das Protein intrazellulär im Rahmen von Prozessierungsschritten von der kalziumabhängigen Serin-Protease Furin und anderen Mitgliedern der Prohormon-Convertase-Familie gespalten wird, so dass am Ende ein biologisch aktives, C-terminales Produkt von 12-14 kDa vorliegt [²⁸].

Letzteres besteht aus drei antiparallel angeordneten Paaren von β -Strängen, die durch vier Schleifen (L1-4) miteinander verbunden sind [**Abb. 1**]. Die Hauptstruktur bildet hierbei ein aus drei ineinandergewundenen Disulfidbrücken gebildeter Cystein-

Knoten, durch den sich die Neurotrophine in die Gruppe der sog. Cystein-Knoten Superfamilie einordnen lassen.

Alle Neurotrophine weisen untereinander eine große Homologie bezüglich ihrer Aminosäuresequenz auf. Diese betrifft im Besonderen den Bereich der β -Stränge, denen man eine maßgebliche Beteiligung an der Stabilisierung der Tertiärstruktur zuschreibt, während die Sequenzen im Bereich der N- und C-Termini sowie der Schleifen aufgrund ihrer hohen Variabilität vermutlich eine funktionelle Rolle bei der Rezeptorbindung und -aktivierung spielen.

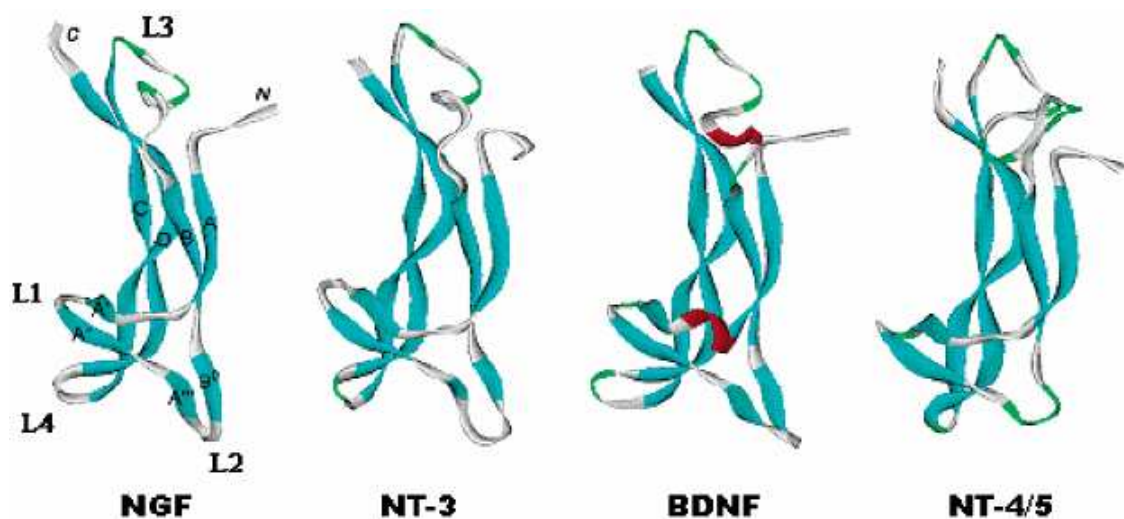


Abb. 1: Struktur der Neurotrophin-Monomere [¹⁴³].

Die Sekretion erfolgt hauptsächlich in Form von biologisch aktiven Protein-Homodimeren mit einer Masse von ~ 25 kDa, innerhalb derer die beiden Untereinheiten durch nicht-kovalente Bindungen entlang der β -Stränge zusammengehalten werden [⁸²] [**Abb. 2**].

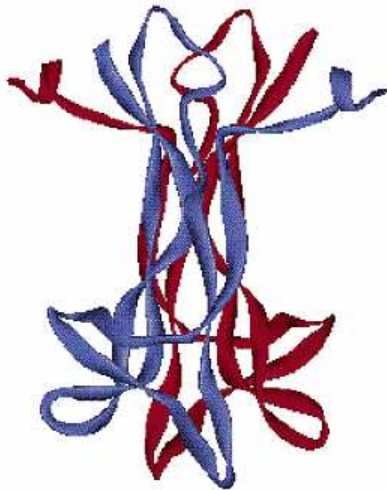


Abb. 2: Struktur eines NGF-Dimers [¹⁴³].

Ergänzend sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Gesamtmenge an sezernierten Neurotrophinen zu einem gewissen Anteil auch aus unprozessierten Pro-Neurotrophinen besteht, die neben einer intrazellulären Funktion als Precursor-moleküle eine weitere Funktion in der Signaltransduktion außerhalb der Zelle ausüben [¹⁰⁵].

1. 1. 4 Rezeptoren der Neurotrophine

Alle Mitglieder der Neurotrophinfamilie zeichnen sich durch die besondere Fähigkeit aus, ihre zelluläre Wirkung über Aktivierung von zwei unterschiedlichen Typen von Oberflächenrezeptoren entfalten zu können.

Bei den genannten Oberflächenrezeptoren handelt es sich zum einen um einen der drei spezifischen *tropomyosin-related-kinase* (trk)-Rezeptoren der Tyrosinkinase-Rezeptorenfamilie (trkA, trkB und trkC), zum anderen um den p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75^{NTR}), Mitglied der TNF-Rezeptor/Fas/CD40-Superfamilie.

Das Binden der einzelnen Neurotrophine an die unterschiedlichen trk-Rezeptoren weist eine bestimmte Selektivität auf, nach der NGF bevorzugt mit trkA, BDNF bzw. NT-4/5 mit trkB und NT-3 mit trkC interagiert. Hinzu kommt, dass NT-3 auch an den trkA- bzw. trkB-Rezeptor binden kann, welches jedoch einer niedrigeren Affinität unterliegt als das Binden an den trkC-Rezeptor [^{104, 143}] [**Abb. 3**].

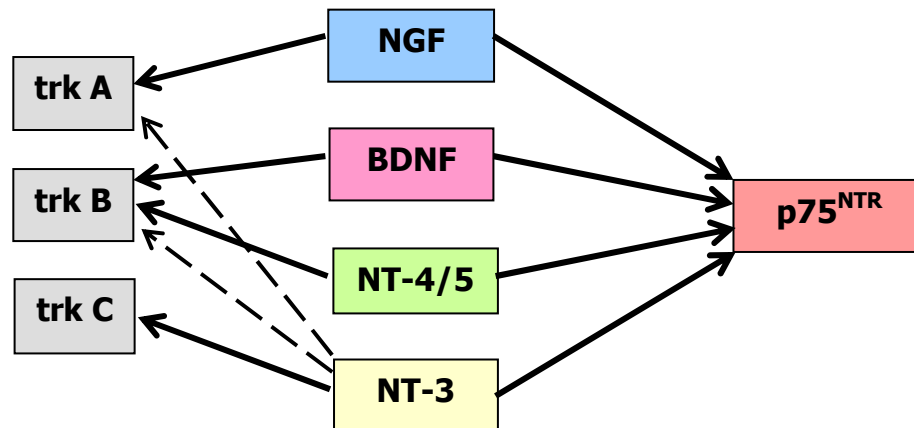


Abb. 3: Interaktionen zwischen den Neurotrophinen und ihren Rezeptoren.

Im Gegensatz zu den trk-Rezeptoren bindet der $p75^{\text{NTR}}$ alle Neurotrophine unselektiv und kann zudem – bei niedrigen Neurotrophinkonzentrationen – als Korezeptor für trk-Rezeptoren fungieren, wodurch über eine Konformationsänderung innerhalb des trk-Rezeptors die Selektivität des trk-Rezeptors für seinen jeweiligen Liganden verstärkt wird [216]. Beispielsweise steigert $p75^{\text{NTR}}$ die Bindungsaffinität von trkA zu NGF während er gleichzeitig die Bindungsaffinität des Rezeptors zu NT-3 herabsetzt. In ähnlicher Weise moduliert $p75^{\text{NTR}}$ die Interaktion zwischen trkB und BDNF, NT-3 und NT-4/5 [11, 187].

Die anfängliche Einteilung, bei der trk-Rezeptoren als Rezeptoren mit „hoher“ Bindungsaffinität zu NT dem $p75^{\text{NTR}}$ als Rezeptor mit „niedriger“ Bindungsaffinität zu NT gegenübergestellt wurden, ist mittlerweile aufgrund zweier Tatsachen obsolet:

- Die Dissoziationskonstante (K_d) als reziprokes Maß der Bindungsaffinität beträgt für den Komplex aus trk-Rezeptor-Neurotrophin $10^{-9} - 10^{-10} \text{ M/l}$ und liegt somit deutlich über der des bereits zuvor beschriebenen gemeinsamen Komplexes aus (trk-Rezeptor+ $p75^{\text{NTR}}$)-Neurotrophin ($K_d=10^{-11} \text{ M/l}$) [54, 104];
- Pro-Neurotrophine weisen eine höhere Bindungsaffinität zum $p75^{\text{NTR}}$ als zu den trk-Rezeptoren auf [104, 186].

1. 1. 4. 1 trk-Rezeptoren

1. 1. 4. 1. 1 Struktur der trk-Rezeptor-Gene und molekulare Mechanismen der Regulation ihrer Transkription

Den bisherigen Erkenntnissen nach ähneln sich die Gene der trk-Rezeptoren in ihrer Struktur. Die Kodierung des extrazellulären Anteils erfolgt durch neun (trkA und trkC) bzw. zehn (trkB) Exons. Aufgrund von alternativem Splicing existieren verschiedene Varianten der drei Rezeptoren, die sich in der Spezifität ihrer Interaktion mit ihrem Liganden von ihren Normvarianten erheblich unterscheiden [80].

Die Promotor-Regionen aller Gene für trk-Rezeptoren sind durch das Fehlen einer TATA-Box sowie einem relativen Reichtum an Guanin und Cytosin charakterisiert. Auch sie weisen eine große Ähnlichkeit bezüglich ihrer Sequenz untereinander auf [119].

Das Wissen über vermeintliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ist sehr vage und begrenzt sich derzeit auf den Nachweis einer Regulationseinheit in der proximalen Region des trkA Promotors, an die der Transkriptionsfaktor SP-1 bindet [163, 168].

1. 1. 4. 1. 2 Struktur der trk-Rezeptoren

Bisweilen besteht noch großer Mangel an Wissen über die präzise dreidimensionale Struktur dieser Rezeptoren. Über die extrazellulären Domänen ist bekannt, dass sie aus fünf Subdomänen gebildet werden, die sich zusammensetzen aus einer leucinreichen Region (LRR, Domäne 2), die beiderseits von cysteinreichen Regionen (CR, Domäne 1 und 3) flankiert wird, gefolgt von zwei immunglobulinähnlichen Regionen (Domäne 4 und 5), die der Zellmembran am nächsten lokalisiert sind. Man vermutet, dass die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne über eine helikale, transmembranäre Region mit dem extrazellulären Anteil verbunden ist [84, 158, 169] [Abb. 5].

Anhand von Kristallstrukturanalysen konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass bei trk-Rezeptoren neben der Domäne 2 [206] besonders die Domäne 5 die hohe Affinität der Neurotrophinbindung bedingt [192]. Beispielsweise führte ein Austausch der Domäne 5 zwischen trk-Rezeptoren zu einem ligandenspezifischen Wechsel in der Bindungsaffinität des jeweiligen trk-Rezeptors [144], während eine Deletion dieser Domäne in trkA- und trkC-Rezeptoren in einer abgeschwächteren Bindungsaffinität für NGF und NT-3 resultierte [193].

1. 1. 4. 1. 2. 1 gp145trkB und gp95trkB

Bedingt durch alternatives Splicing existieren sowohl von trkB als auch von trkC Isoformen, die sich im Hinblick auf ihre intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne voneinander unterscheiden [80]. Im Falle des trkB wird zwischen dem gp145trkB Rezeptor und dem gp95trkB Rezeptor differenziert.

Während beide in Bezug auf ihre extrazelluläre und transmembranäre Domäne miteinander identisch sind und somit eine gleiche Ligandenspezifität besitzen, weist der gp95trkB Rezeptor anstelle der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne lediglich eine kurze zytoplasmatische Sequenz auf [95, 111, 123]. Daher wurde diesem zunächst eine modulatorische Funktion auf BDNF-abhängige Signalwege zugeschrieben. Korrespondierend hierzu konnte nachgewiesen werden, dass gp95trkB Rezeptoren in nicht-neuronalen Zellen als Ligandenfänger fungieren, mittels derer die Zellen einen Einfluss auf die extrazelluläre Konzentration des BDNF ausüben und somit seine Aktivität modulieren können [12, 162].

In Nervenzellen, die beide Formen des trkB Rezeptors exprimierten, konnte eine zusätzliche Funktion des gp95trkB als dominant-negativer Regulator der Aktivität des gp145trkB aufgezeigt werden. Hierbei führte eine Sequestrierung des gp145trkB in einem funktionslosen Heterodimer aus gp95trkB/gp145trkB zum Ausbleiben der über gp145trkB vermittelten Signalkaskaden [27, 50, 132] [Abb. 4].

Die Beobachtung, dass murine Nervenzellen, die keine trkB Rezeptoren exprimieren konnten ($\text{trkB}^{-/-}$), über eine höhere Überlebensrate verfügten als Nervenzellen, die nur den gp95trkB Rezeptor exprimieren konnten ($\text{trkB}_{\text{gp145}}^{-/-}$), deutet zudem auf eine hemmende Wirkung von gp95trkB auf das Überleben von Zellen hin [112].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der gp95trkB Rezeptor hauptsächlich eine modulatorische Funktion auf BDNF-abhängige Signalwege ausübt, die sowohl von unterstützendem als auch entgegengesetztem Charakter sein kann. Zudem ist er im Stande unabhängig von der Anwesenheit des gp145trkB Rezeptors selbständig regulatorische Aktivitäten auszuüben [¹²⁴].

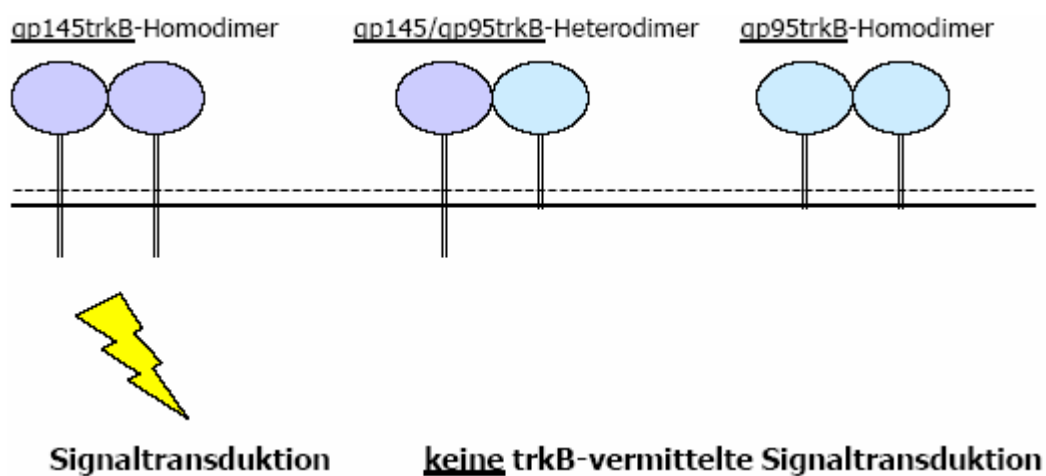


Abb. 4: Schematische Darstellung möglicher Dimerisationsformen von trkB-Monomeren im Rahmen der Neurotrophinbindung.

1. 1. 4. 2 p75^{NTR}

1. 1. 4. 2. 1 **Struktur des p75^{NTR}-Gens und molekulare Mechanismen der Regulation seiner Transkription**

Das p75^{NTR}-kodierende Gen besteht aus sechs Exons. Die Promotor-Region ist in Analogie zu den Promotor-Regionen der trk-Rezeptoren durch das Fehlen einer TATA-Box sowie einem relativen Reichtum an Guanin und Cytosin charakterisiert [63, 119].

Im Zuge intensiver Untersuchungen konnten mittels transgener Technologie spezifische Regulationseinheiten des Gens für p75^{NTR} identifiziert und verschiedene Regulationsmechanismen seiner Transkription aufgedeckt werden. Beispielsweise fand man heraus, dass in Schwann-Zellen nach Nervenschädigung eine Aktivierung der Promotor-Region durch einen Transkriptionsfaktor mit Zinkfingerdomäne, Zif268 herbeigeführt wird [63, 131] bzw. eine Unterdrückung der Aktivität durch Bindung des Transkriptionsfaktors ME1 an eine E-Box-Region im proximalen Promotor erfolgt [29].

1. 1. 4. 2. 2 **Struktur des p75^{NTR}**

Zwar fehlen bislang Daten über die Kristallstruktur des p75^{NTR}, jedoch geht man davon aus, dass die extrazelluläre Domäne des Rezeptors von vier *cystein-repeat*-Subdomänen (CR1-4) gebildet wird, unter denen die Subdomänen CR2 und CR3 an der Bindung von Neurotrophinen maßgeblich beteiligt sind. Der intrazelluläre Anteil beinhaltet Domänen für die Regulation von Apoptose und Zelltod [143] [**Abb. 5**].

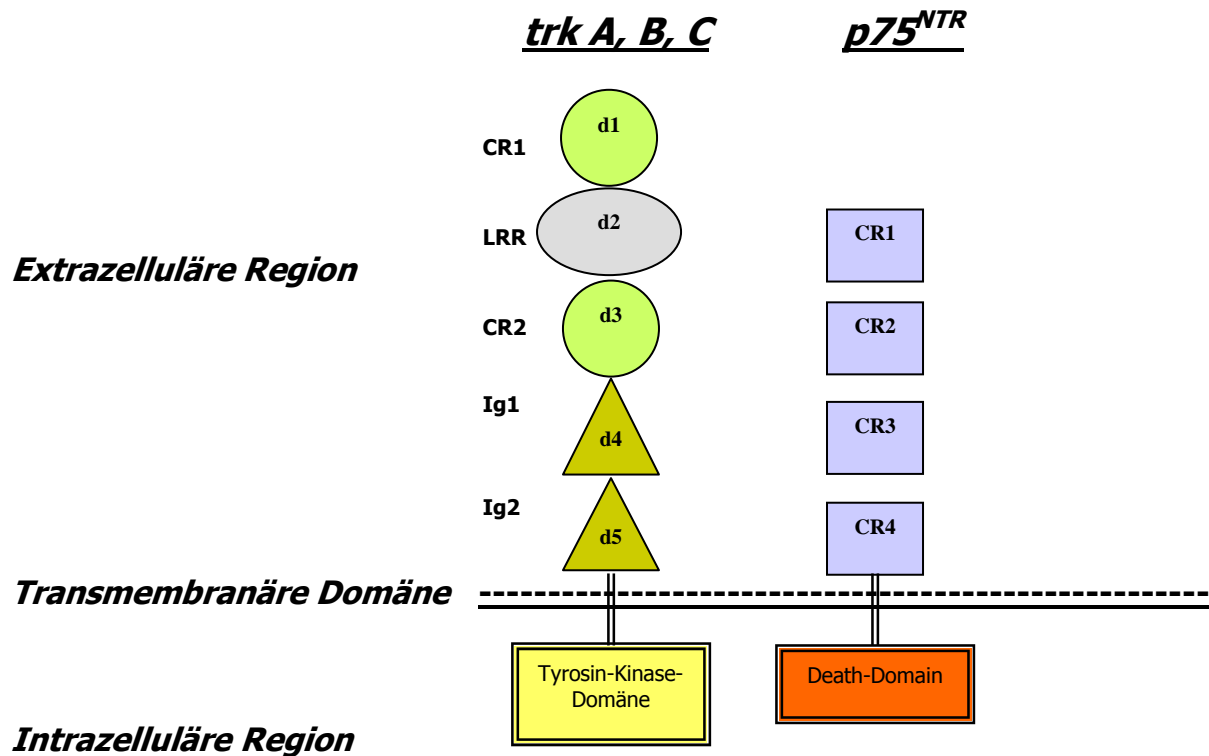


Abb. 5: Schematische Darstellung der Neurotrophinrezeptoren [nach ¹⁴³].

1. 1. 4. 3 Signaltransduktion über Neurotrophinrezeptoren

1. 1. 4. 3. 1 Signaltransduktion über trk-Rezeptoren

Das Binden der Neurotrophin-Dimere an die trk-Rezeptoren bewirkt eine Dimerisation der Rezeptorproteine mit anschließender Aktivierung der Tyrosinkinase. Über Phosphorylierung von Tyrosinresten werden hierbei Bindungsstellen für Adaptorproteine generiert, mittels derer die Rezeptoren an verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden gekoppelt werden.

Unter den Tyrosinresten nehmen die Reste Y490 und Y785 eine besondere Stellung ein, da sie über die Interaktion mit dem *Src homologous and collagen-like* Adaptorprotein (Shc) bzw. der *Phospholipase C-γ1* (PLC-γ1) Signalwege induzieren, die der Proliferation, dem Überleben und der Differenzierung der Zelle dienen. Hierunter fallen hauptsächlich der Ras/*extracellular signal regulated kinase* (ERK) Proteinkinase

Signalweg, der *Phosphatidylinositol-3-OH* Kinase (PI3K)/*Akt* Kinase Signalweg sowie der *Phospholipase C-γ1* Signalweg [6, 169] [Abb. 6].

Im Folgenden sollen diese kurz vorgestellt werden. Es ist darauf hinzuweisen, dass bei der folgenden Beschreibung der Interaktionen von trk-Rezeptoren mit den Adaptorproteinen und den Signaltransduktionswegen ein Vorhandensein aller beteiligten Signalmoleküle innerhalb der Zelle vorausgesetzt wird, was in der Natur nicht der Fall ist. Letzteres erklärt die Tatsache, dass durch trk-Rezeptoren vermittelte Signale unterschiedliche Antworten in unterschiedlichen Zellen induzieren.

1. 1. 4. 3. 1. 1) Ras Signalweg

In Nervenzellen konnte gezeigt werden, dass über den Ras-Signalweg der Vorgang der Zelldifferenzierung geregelt wird. Zusätzlich fördert die Aktivierung dieser Kaskade über PI3K oder dem *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/ERK Signalweg das Überleben von Zellen [93, 211]. Ob nun die Bindung von Neurotrophinen eine Proliferation oder Differenzierung induziert, hängt vom Maß der Aktivierung des ERK-Signalweges ab.

Eine kurzweilige Aktivierung induziert hauptsächlich Proliferation und Überleben wohingegen protrahierte Aktivierung den Differenzierungsvorgang initiiert [178]. Die Regulation des unterschiedlichen Ausmaßes der Aktivierung wird durch Rekrutierung von verschiedenen Adaptorproteinen an phosphoryliertes Y490 und der damit verbundenen konsekutiven Initiierung zweier verschiedener Signalwege bewerkstelligt.

So führt die Rekrutierung und anschließende Phosphorylierung von Shc über Aktivierung eines Komplexes bestehend aus dem Adaptorprotein Grb-2 und dem Ras *exchange factor son of Sevenless* (SOS) zu einer kurzweiligen Aktivierung von Ras. Ras aktiviert nachfolgend PI3K, den p38 MAPK/MAPK-*activating protein kinase 2* Signalweg sowie den c-Raf/ERK Signalweg, zu dessen Zielen die ribosomalen S6 Kinasen (RSK) zählen. Zusammen mit MAPK-*activating protein kinase 2* phosphorylieren RSK neben anderen Transkriptionsfaktoren das CRE-*binding protein* (CREB), das die Transkription von Genen reguliert, die nachweislich eine essentielle Rolle für das in-vitro Überleben von Nervenzellen spielen [13, 18, 215].

Im Gegensatz dazu erfolgt die protrahierte Aktivierung von ERK und die damit verbundene Induktion des Differenzierungsvorgangs durch das Binden des Adaptorproteins *fibroblast growth factor receptor substrate* (FRS)-2 an phosphoryliertes Y490 ab. Hierbei entstehen an den zahlreichen Tyrosinresten des FRS-2 Bindungsstellen für zusätzliche Proteine, wie den Adaptorproteinen Grb-2 und CRK, dem *protein phosphatase Src homology protein tyrosine phosphatase-2* (SH-PTP), dem *cyclin-dependent kinase substrate p13suc1* und Src. Durch das Binden von CRK an FRS-2 wird eine Kaskade ausgelöst, bei der CRK zunächst den *exchange factor C3G* bindet und aktiviert, der wiederum das kleine G-Protein Rap-1 aktiviert. Über B-raf resultiert dann letztlich die protrahierte Aktivierung des ERK-Signalweges [5,118, 212]. Zusätzlich kann die Aktivierung des letzteren durch SH-PTP-2 begünstigt werden, der hierfür an den *Grb2-associated-binder*(Gab)-1 bindet [31, 76]. FRS-2 stellt zudem eine Verbindung zu Tyrosin-Kinasen der Src-Familie dar, die an verschiedenen Zellantworten, u. a. der Endozytose von Rezeptoren beteiligt sind [145, 158, 204].

1. 1. 4. 3. 1. 2 PI3K Signalweg

Die Aktivierung der PI3K durch trk-Rezeptoren dient dem Überleben von Zellen und kann auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen: zum einen über Bindung von aktiviertem Ras an PI3K, zum anderen –in einem Ras-unabhängigen Weg– über die drei Adaptorproteine Shc, Grb-2 und Gab-1 [76, 158].

Eine Verbindung beider Signalwege stellt die durch Gab-1 induzierte Proteinphosphatase Shp-2 dar, die über bislang ungeklärte Mechanismen die Aktivierung des Ras/ERK Signalwegs verstärkt. Die Lipidprodukte der PI3K rekrutieren und aktivieren unter anderem die Proteinkinase Akt und *3-phosphoinositide-dependent* Kinasen (PDKs). Letztere stellen Akt-Aktivatoren an der Membran dar [214]. Eine Aktivierung von Akt führt schließlich zur Phosphorylierung von zahlreichen Proteinen wie z. B. des BAD (*Bcl-2/Bcl-x associated death promoter*), IκB, des *forkhead transcription factor* (FKHRL1), der Glykogen-Synthase-Kinase (GSK) 3-β und der humanen Caspase 9, die allesamt eine wichtige Rolle in der Regulation des Überlebens von Zellen einnehmen [76, 213]. So fördert beispielsweise BAD, ein

Mitglied der Bcl-2 Familie, in unphosphoryliertem Zustand die Apoptose durch Bindung an Bcl-xL. Dieser Vorgang wird durch Phosphorylierung von BAD durch Akt bzw. die MAPKs unterbunden [76].

Die Phosphorylierung von I κ B hingegen aktiviert NF κ B, einen Faktor, der die Transkription von Genen aktiviert, die das Überleben der Zelle fördern [62]. Der Transkriptionsfaktor FKHRL1 leitet die Expression von Genen ein, die an der Apoptose beteiligt sind, wie beispielsweise dem Fas Liganden (FasL). Phosphoryliertes FKHRL1 wird im Zytoplasma gehalten und dadurch an der Translokation in den Zellkern gehindert [22].

Unter Entzug von Neurotrophen konnte in kultivierten Nervenzellen gezeigt werden, dass die Apoptose über Steigerung der GSK 3- β -Aktivität eingeleitet wurde, während dieses durch Phosphorylierung durch Akt gehemmt werden konnte [69].

Zusammenfassend wird deutlich, dass das Überleben von Zellen über verschiedene Mechanismen des PI3K/Akt Signalwegs vermittelt wird.

1. 1. 4. 3. 1. 3 PLC- γ 1 Signalweg

Durch Phosphorylierung des Tyrosinrestes Y785 des trkA-Rezeptors und ähnlich lokalisierten Tyrosinresten der übrigen trk-Rezeptoren entsteht eine Bindungsstelle für PLC- γ 1, die nach Aktivierung Phosphatidylinositide (PIP2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) aufspaltet. Während IP₃ über Steigerung der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration unterschiedliche Ca²⁺-abhängige Signalwege aktiviert, ist DAG imstande, über die Proteinkinase C (PKC)- δ die ERK-Kaskade zu aktivieren [158, 169].

Zudem sind trk-Rezeptoren in der Lage über Aktivierung des PLC- γ 1 Signalweges einen regulatorischen Einfluss auf die Expression und Funktion von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren und Ionenkanälen auszuüben [30, 94, 124].

1. 1. 4. 3. 1. 4 Regulation der Signaltransduktionswege durch transmembranären Transport des Neurotrophin-trk-Rezeptor-Komplexes

Einige der oben erwähnten Adaptorproteine und Signalmoleküle sind in unterschiedlichen Membrankompartimenten lokalisiert und können nur über einen spezifischen, membranären Transport des Neurotrophin-trk-Rezeptor-Komplexes aktiviert werden. Dieser Transport erfolgt mittels eines sog. Signal-Endosomens, der im Anschluss an die Endozytose des Ligand-Rezeptor-Komplexes geformt wird [25]. So weiß man beispielsweise über den Rap-1 und B-raf Signalweg, der über eine protrahierte Aktivierung der ERK-Kaskade die Zelldifferenzierung einleitet, dass dieser über eine Endozytose des Neurotrophin-Rezeptor-Komplexes aktiviert wird [37, 211]. Die Existenz spezifischer Transportmechanismen erweitert somit die Bandbreite komplexer Regulationsmechanismen der durch trk-Rezeptoren vermittelten Signaltransduktionswege.

1. 1. 4. 3. 1. 5 Transaktivierung von trk-Rezeptoren

Neben den Neurotrophinen können auch kleinere Moleküle über trk-Rezeptoren trophische, d. h. das Überleben fördernde Reaktionen einleiten. Diese Transaktivierung wird durch die sog. *G-protein-coupled receptors* (GPCR) bewerkstelligt. So konnte man in hippocampalen Ganglienzellen und Zellen der Phäochromozytomzelllinie PC12 zeigen, dass Adenosin und das Neuropeptid *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), beide Liganden von GPCR, trk-Rezeptoren in Abwesenheit von Neurotrophinen aktivieren konnten [85, 210]. Dieser Vorgang erfolgte im Vergleich zu der trk-Aktivierung durch Neurotrophine sehr langsam (>1-2 Stunden) und förderte über Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges hauptsächlich das Überleben von Zellen [217].

Somit handelt es sich hierbei um einen Kompensationsmechanismus, der besonders in Abwesenheit von Neurotrophinen zu tragen kommt und bei dem Liganden von GPCR über trk-vermittelte Signalwege eine zellprotektive Funktion ausüben.

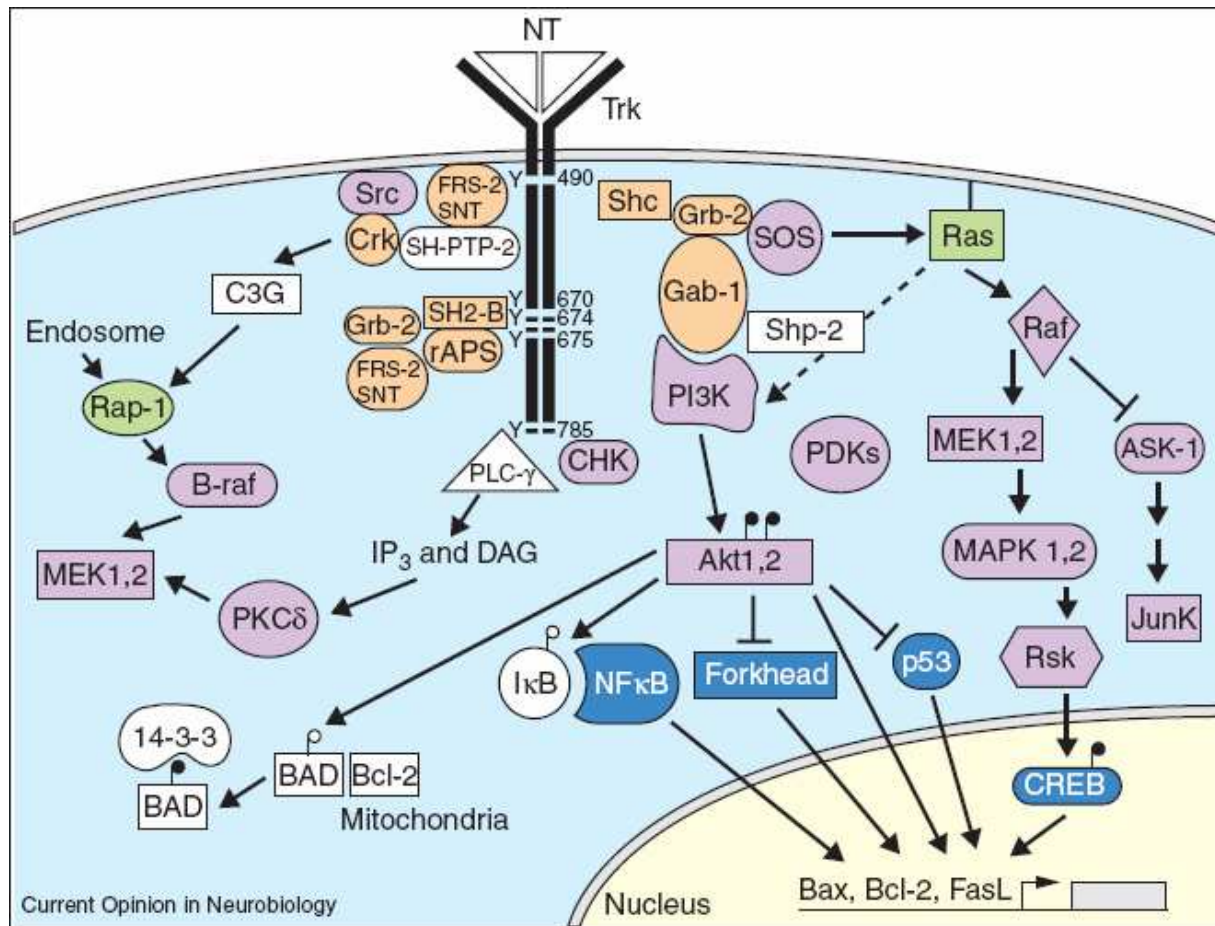


Abb. 6: Signaltransduktionswege über trk-Rezeptoren [142]. [Abkürzungen: AKT - *Serin/Threonin Kinase*; CREB - *cAMP response element binding protein*; DAG - *Diacylglycerol*; FRS-2 - *fibroblast receptor substrate-2*; MAPK - *mitogen activated protein kinase*; MEK - *MAPK Kinase*; PI3K - *Phosphatidylinositol-3-Kinase*; IP3 - *Inositol-1,4,5-triphosphat*; PLCγ - *Phospholipase Cγ*].

1. 1. 4. 3. 2 Signaltransduktion über p75^{NTR}

Auf zellulärer Ebene führt die Bindung von Neurotrophenen an den p75^{NTR} zur Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signaltransduktionswege. Diese schließen u. a. die Aktivierung von NF-κB (*nuclear factor κB*), der JNK (c-Jun N-terminal Kinase) sowie der sauren Sphingomyelinase ein. Während NF-κB das Überleben von Zellen fördert, induziert die Aktivierung der JNK und der Sphingomyelinase den Apoptosevorgang [142, 210].

Interessanterweise unterliegen letztere Signalkaskaden bei Koexpression von p75^{NTR} mit trk-Rezeptoren einem modulatorischen Einfluss durch aktivierte trk-Rezeptoren [48], der sich letztendlich in einer Hemmung der Sphingomyelinaseaktivität sowie

einer weitgehenden Unterdrückung der JNK Kaskade widerspiegelt [24, 35, 148]. Folglich resultiert im Hinblick auf den Apoptosevorgang ein präventiver Effekt zu dem eine gleichzeitig über p75^{NTR}-vermittelte Aktivierung des NF-κB Signalweges in synergistischer Weise beiträgt [39].

Die Qualität der Zellantwort auf Neurotrophine hängt somit u. a. von dem Verhältnis zwischen p75^{NTR} und trk-Rezeptoren an der Zellmembran ab, das die Neurotrophine dazu befähigt, sowohl anti- als auch proapoptotische Wirkungen entfalten zu können [102].

1. 1. 4. 3. 2. 1 Interaktion von Pro-Neurotrophinen mit p75^{NTR}

Mittlerweile konnten Pro-Neurotrophine als effektive Liganden für p75^{NTR} identifiziert werden, die den Apoptosevorgang über Bindung an ein duales Rezeptorsystem, bestehend aus p75^{NTR} und dem Sortilin Vps10p Rezeptor, induzieren können [105, 138, 185]. Die Formation des Rezeptorkomplexes generiert hierbei eine hohe Bindungsaffinität für Pro-Neurotrophine, die mit ihrer reifen Domäne an p75^{NTR} binden und über ihre Pro-Domäne mit dem Sortilin Rezeptor interagieren.

Eine zusätzlich geringe biologische Aktivität an trk-Rezeptoren, die zu einer Inhibition der o. g. suppressiven Wirkung eines aktivierten trk-Rezeptors auf die p75^{NTR}-vermittelte Aktivierung der JNK Kaskade und Sphingomyelinase führt, macht die Pro-Neurotrophinen zu hochpotenten Initiatoren der Apoptose.

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle erwähnt, dass das Verhältnis von Neurotrophinen zu Pro-Neurotrophinen und –im weitesten Sinne— von Überleben und Apoptose nicht nur auf intrazellulärer, sondern auch auf extrazellulärer Ebene einer Regulation unterliegt. So ist mittlerweile bekannt, dass extrazelluläre Proteasen wie das Plasmin oder spezifische Matrix-Metallproteinasen, deren Konzentrationen bei Entzündungsgeschehen neben denen der Neurotrophine ebenfalls erhöht sind, imstande sind, Pro-Neurotrophine in ihre reife Form zu spalten [105].

1. 2 Physiologische Neurotrophinexpression in der Lunge

1. 2. 1 Neurotrophine und Innervation der Lunge

Unter physiologischen Bedingungen sind Neurotrophine in der Lunge während der embryonalen Entwicklung hauptsächlich an der Innervation des Organs beteiligt. Hierbei dienen sie als Überlebensfaktoren für viszero-afferente Nervenzellen, die größtenteils im *Ganglion inferius nervi vagi* und in geringer Anzahl auch in Spinalganglien lokalisiert sind [170]. So führte die Deaktivierung des BDNF- bzw. trkB-Rezeptor-Gens in Mäusen während der embryonalen Entwicklungsphase zu einem Apoptose-bedingten Untergang von neuronalen Subpopulationen mit einem konsekutiven Defizit hinsichtlich der Atemkontrolle [52, 64].

Nach Abschluß der Entwicklungsphase können Neurotrophine die Funktion von viszero-afferenten Nervenzellen beeinflussen, indem sie z. B. die Synthese von Neuropeptiden hochregulieren oder über Herabsetzen des Schwellenpotentials ihre Erregbarkeit steigern [53, 101].

In Anbetracht der vielfältigen, regulatorischen Funktionen des vegetativen Nervensystems innerhalb der Lunge, die u. a. die Regulation des Tonus der glatten Muskelzellen, der Schleimsekretion, der bronchialen Mikrozirkulation, der mikrovaskulären Permeabilität sowie der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen beinhaltet [26, 70, 197], stellt die physiologische Expression von Neurotrophinen eine wichtige Voraussetzung für die funktionelle Integrität der Atemwege dar.

1. 2. 2 Neurotrophine und nicht-neuronales Lungengewebe

Das Wissen um die Expression von Neurotrophinen außerhalb des Nervengewebes ist derzeit begrenzt. Studien diesbezüglich befassen sich hauptsächlich mit dem Immunsystem und spiegeln größtenteils pathophysiologische Situationen wider. Somit existiert auch für das Lungengewebe im Hinblick auf die Expression von Neurotrophinen und ihrer Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen nur lückenhaftes Wissen.

Über Zellen des Lungeninterstitiums weiß man mittlerweile, dass glatte Muskelzellen sowie Fibroblasten eine konstitutive Expression von NGF aufweisen, die einer positiven Regulation seitens asthmaassoziierter, proinflammatorischer Zytokine unterliegt [57, 90].

Interessanterweise exprimieren Fibroblasten zudem die Neurotrophin-Rezeptoren trkA und p75^{NTR}, wodurch sie in der Lage sind, auf exokrines sowie autokrines NGF zu reagieren. Hierbei wird durch NGF die chemotaktische Wanderung der Fibroblasten stimuliert und zusätzlich über eine Induktion der Expression von α -Aktin und Kontraktion der Kollagenmatrix eine Veränderung des Phänotyps hin zu dem der Myofibroblasten bewirkt [121, 122].

Auch wenn die Expression von Neurotrophinen innerhalb des respiratorischen Epithels bislang nicht hinreichend untersucht worden ist, impliziert der Nachweis einer ausgeprägten Expression von NGF in Epithelzellen aus Bronchialbiopsien von Asthmatikern eine Beteiligung des respiratorischen Epithels an der Neurotrophinproduktion innerhalb der Lunge [88].

Diese Beobachtung ist insofern interessant, als dass in den bisherigen Studien eine Expression von Neurotrophinen in Epithelzellen lediglich in Zusammenhang mit der Entwicklung der Zähne [137] sowie von Organen des gustatorischen [81, 179] und olfaktorischen Systems nachgewiesen werden konnte [23].

1. 3 Rolle der Neurotrophine in entzündlichen Lungenerkrankungen

Während in Untersuchungen an Ratten und Mäusen gezeigt werden konnte, dass die allgemeine postnatale Expression von Neurotrophinen innerhalb des Lungengewebes mit steigenden Lebensjahren rückläufig ist [^{79, 110}], gehen besonders pathologische Prozesse innerhalb der Lunge, wie sie z. B. im Rahmen des allergische Asthmas auftreten, mit einer gesteigerten Konzentration an lokalen und zirkulierenden Neurotrophinen einher [^{60, 140}].

Beispielsweise fand man in der bronchoalveolären Flüssigkeit von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale nach einer segmentalen Allergenprovokation gesteigerte Konzentrationen an BDNF-, NGF- und NT-3 vor [¹⁹⁸]. Interessanterweise war diese Hochregulation mit der Spätphase der allergischen Reaktion verbunden. Da in dieser Phase bekanntlich die Infiltration der Lunge mit Immunzellen erfolgt, wurde über den zeitlichen Zusammenhang zwischen Konzentrationssteigerung an Neurotrophinen und Infiltration der Lunge mit Immunzellen auf einen kausalen Zusammenhang geschlossen. Diese Vermutung wurde zusätzlich durch die Beobachtung gestützt, dass Asthmakranke nach Inhalation von Glucocorticoiden niedrigere Konzentrationen an zirkulierendem NGF und BDNF aufwiesen als ohne Inhalation von Glucocorticoiden [¹³⁶].

In Tiermodellen und in-vitro Studien konnte letztlich nachgewiesen werden, dass in der Tat Immunzellen eine Hauptquelle für NGF und BDNF darstellen [^{60, 133, 196}]. So synthetisieren eosinophile Granulozyten und Mastzellen u. a. NGF [^{115, 153, 196}], während T- und B-Lymphozyten sowie Makrophage und Monozyten in Abhängigkeit von ihrer Aktivität und Population BDNF und NGF sezernieren können [^{38, 49, 100, 164}]. Ergänzend sei in diesem Rahmen auch auf die Zellen des Lungeninterstitiums hingewiesen, die – wie bereits zuvor erwähnt – an der Expression von Neurotrophinen innerhalb des Lungengewebes beteiligt sind.

Zusammengefasst implizieren diese Ergebnisse somit eine Beteiligung der Neurotrophine an der Pathogenese von entzündlichen Lungenerkrankungen, insbesondere des allergischen Asthmas.

1. 3. 1 Allergisches Asthma bronchiale

Das allergische Asthma ist gekennzeichnet durch eine chronische Entzündung der Atemwege, eine variable Atemwegsobstruktion nach Allergeninhalation und eine Zunahme der Empfindlichkeit der Atemwege auf eine Vielzahl von Reizen (bronchiale Hyperreaktivität). Der Immunpathologie liegt neben der Immunglobulin E (IgE)-vermittelten Degranulation von Mastzellen eine verstärkte Infiltration der Atemwege mit Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten zugrunde. Diese bedingen eine allgemein gesteigerte Synthese von proinflammatorischen und zytotoxischen Mediatoren innerhalb des Lungengewebes. Letztere führen über eine Gewebszerstörung zu Reparationsvorgängen innerhalb der Atemwege und sind verantwortlich für langfristige Umbauvorgänge des Lungenparenchyms [78]. Die strukturellen Veränderungen sind charakterisiert durch eine Hyper- und Metaplasie von epithelialen Becherzellen, einer Zunahme der Masse glatter Muskelzellen und einer gesteigerten Angiogenese. Zudem kommt es zu einer vermehrten Ablagerung von interstitiellem Kollagen über die *Lamina reticularis* der Basalmembran hinaus mit Beteiligung der gesamten Wand der Atemwege. Letzteres Merkmal tritt unabhängig von der Erkrankungsdauer auf, korreliert jedoch mit der Ausprägung der Erkrankung [19].

Man geht davon aus, dass beim allergischen Asthma viele Aspekte der pathologischen Immunreaktionen, wie z. B. die Funktion der B-Lymphozyten, der Mastzellen und eosinophilen Granulozyten durch Typ 2 T-Helferzellen (T_H2) vermittelt werden [130]. Aus der großen Bandbreite an Zytokinen, die im Rahmen des Entzündungsgeschehens von diesen sezerniert werden, sind besonders die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 hervorzuheben. So bewirken IL-4 und IL-13 in B-Lymphozyten einen Isotypenwechsel der Immunglobuline hin zum IgE, während IL-5 die Rekrutierung, Differenzierung und das Überleben von eosinophilen Granulozyten fördert.

Insgesamt stellt das allergische Asthma eine komplexe Erkrankung dar, die nicht auf eine alleinige immunologische Dysregulation zurückgeführt werden kann. Mittlerweile deuten zahlreiche Beobachtungen darauf hin, dass neben der immunologischen Dysregulation eine neuronale Dysregulation an der Pathogenese

dieser Erkrankung beteiligt ist [^{133, 147}] und dass darüber hinaus pathologische Reparaturmechanismen des Lungenepithels sowie Umbauvorgänge innerhalb eines genetisch-anfälligen Bindegewebes zu einer Persistenz der Erkrankung führen [⁷⁸].

1. 3. 1. 1 Innervation der Lunge und das Konzept der neurogenen Entzündung

Die Innervation der Lunge kann funktionell in ein cholinerges, adrenerges sowie ein nicht-adrenerg-nicht-cholinerges (NANC) System unterteilt werden. Diese lassen sich anatomisch nicht strikt voneinander trennen. Beispielsweise können bestimmte Wirkungen des NANC Systems über Freisetzung von Neuropeptiden aus klassisch cholinergen bzw. adrenergen Nervenzellen vermittelt werden [¹⁴⁷].

Innerhalb des NANC Systems lassen sich funktionell zwei Systeme voneinander unterscheiden, das e-NANC und das i-NANC System. Während das über C-Fasern vermittelte e-NANC System über Tachykinine eine erregende, bronchokonstriktorische Funktion ausübt, vermittelt das von parasymphatischen Nerven gebildete i-NANC System über Stickstoffmonoxid (NO) und dem *vasoactive intestinal peptid* (VIP) eine bronchodilatative Wirkung [⁶⁷].

Eine mit der neuronalen Dysregulation im Rahmen des allergischen Asthmas zusammenhängende Aktivitätssteigerung des bronchokonstriktorischen Systems wird hauptsächlich über cholinerge Nervenzellen vermittelt [⁶⁶]. Als mögliche Mechanismen kommen hierbei in Frage: eine verstärkte Reflexaktivität des cholinergen Systems, eine vermehrte Acetylcholinfreisetzung und eine über vermehrte Expression muskarinerger M₃-Rezeptoren gesteigerte Empfindlichkeit der glatten Muskelzellen gegenüber Acetylcholin [¹⁷⁶].

Interessanterweise können Tachykinine einen verstärkenden Einfluss auf diese cholinergen Mechanismen ausüben [^{32, 47}]. Diese Tatsache gewinnt besonders an Bedeutung, wenn man bedenkt, dass gerade das über Tachykinine kommunizierende e-NANC System unter entzündlichen Bedingungen einen hohen Grad an Plastizität aufweist [^{40, 184}]. Bei den hierbei vorzugsweise in den sensiblen C-Fasern synthetisierten und freigesetzten Tachykininen handelt es sich um die beiden

Neuropeptide Substanz P und Neurokinin A [⁴¹]. Im Anschluss an ihre Biosynthese gelangen sie über axonalen Transport *orthodrom* zu präsynaptischen Nervenendigungen im Rückenmark und dem *nucleus tractus solitarius* sowie *antidrom* in periphere sensible Nervenendigungen, von wo aus sie auf mechanische, thermale, chemische (Capsaicin, Nikotin) oder entzündliche Stimuli (Bradykinin, Histamin, Prostaglandine) freigesetzt werden [²⁰⁷]. Folglich agieren sie zum einen als afferente Neurotransmitter innerhalb des zentralen Nervensystems, zum anderen als efferente, neurosekretorische Mediatoren, die in peripheres Gewebe diffundieren.

Ihre Wirkung entfalten sie über Bindung an die Tachykinin-Rezeptoren NK-1, NK-2 und NK-3. Während NK-1 präferentiell Substanz P bindet, interagiert Neurokinin A hauptsächlich mit NK-2. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die Bindung an NK-3 für Neurokinin B, einem weiteren Mitglied der Tachykininfamilie, vorbehalten ist [⁴¹].

In Analogie zu den Neurotrophen trifft man in den Atemwegen von Asthmatikern eine erhöhte Konzentration an Substanz P an und konnte zudem zeigen, dass eine Allergenprovokation die Konzentration von Neurokinin A in der bronchioalveolären Flüssigkeit steigert [^{126, 127, 218}].

Als Ursache für diese Hochregulation von Substanz P und Neurokinin A innerhalb der Atemwege von Asthmatikern kommen eine gesteigerte Synthese und Freisetzung dieser Neuropeptide bzw. eine verminderte Inaktivierung mittels neutraler Endopeptidasen (NEP) in Frage. Für ersteres spricht die im Vergleich zum gesunden Gewebe erhöhte Anzahl an Substanz P immunreaktiven Nervenfasern beim allergischen Asthma [⁴⁷]. Für letzteres spricht die nachweislich verminderte Aktivität von neutralen Endopeptidasen in Anwesenheit von Allergen und respiratorischen Reizstoffen wie z. B. dem Zigarettenrauch [^{46, 155}].

Im Zuge neuer Erkenntnisse weiß man, dass Neuropeptide und andere Neuro-mediatoren über eine direkte Wirkung auf Immunzellen am Entzündungsgeschehen innerhalb der Atemwege beteiligt sind. Letzteres trifft insbesondere auch auf Tachykinine als Gruppe neuro-immunologischer Transmitter zu [⁴¹].

In Anbetracht des ausgeprägten Expressionsmusters für den Tachykininrezeptor NK-1 in zahlreichen Immunzellen nimmt Substanz P im Rahmen der postulierten Immunmodulation unter allen Tachykininen eine führende Position ein [⁸⁹].

Die Wirkung von Substanz P auf Immunzellen umfasst ein breites Spektrum und betrifft unter anderem eosinophile und neutrophile Granulozyten [55, 177], Makrophage/Monozyten [190], Lymphozyten [174] und Mastzellen [117]. So vermittelt sie die Chemotaxis, Superoxidproduktion und Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an das Endothel und bewirkt eine Degranulation von eosinophilen Granulozyten. Des Weiteren stimuliert sie in Monozyten die Freisetzung von entzündlichen Zytokinen, wie z. B. $\text{TNF}\alpha$ oder IL-1, und löst in T-Lymphozyten die Festlegung des $\text{T}_\text{H}1/\text{T}_\text{H}2$ Phänotyps auf [108]. In B-Lymphozyten moduliert sie zudem die Synthese von Immunglobulin-Isotypen [21].

In Ergänzung zu den Neuropeptiden sind auch nicht-peptiderge Neurotransmitter imstande, eine modulierende Funktion auf das Entzündungsgeschehen auszuüben. Beispielsweise triggert Acetylcholin die Freisetzung von chemotaktisch-aktiven Substanzen aus Alveolarmakrophagen und stimuliert die Proliferation von T-Lymphozyten [99, 157].

Zusätzliche Folgen einer gesteigerten Aktivität von Neuropeptiden und Neurotransmittern beim allergischen Asthma umfassen die Hypersekretion viskösen Schleimes, die Rekrutierung von Immunzellen über eine Hochregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen, eine gesteigerte Gefäßpermeabilität und Extravasation von Plasma mit konsekutiver Ödembildung sowie die Aktivierung des Endothels und Kontraktion glatter Muskelzellen dar [41, 46].

Zusammengefasst resultiert beim allergischen Asthma über eine Steigerung der neuronalen Aktivität eine direkte Potenzierung des Entzündungsgeschehens, so dass man diesbezüglich von einer „*neurogenen Entzündung*“ sprechen darf [Abb. 7].

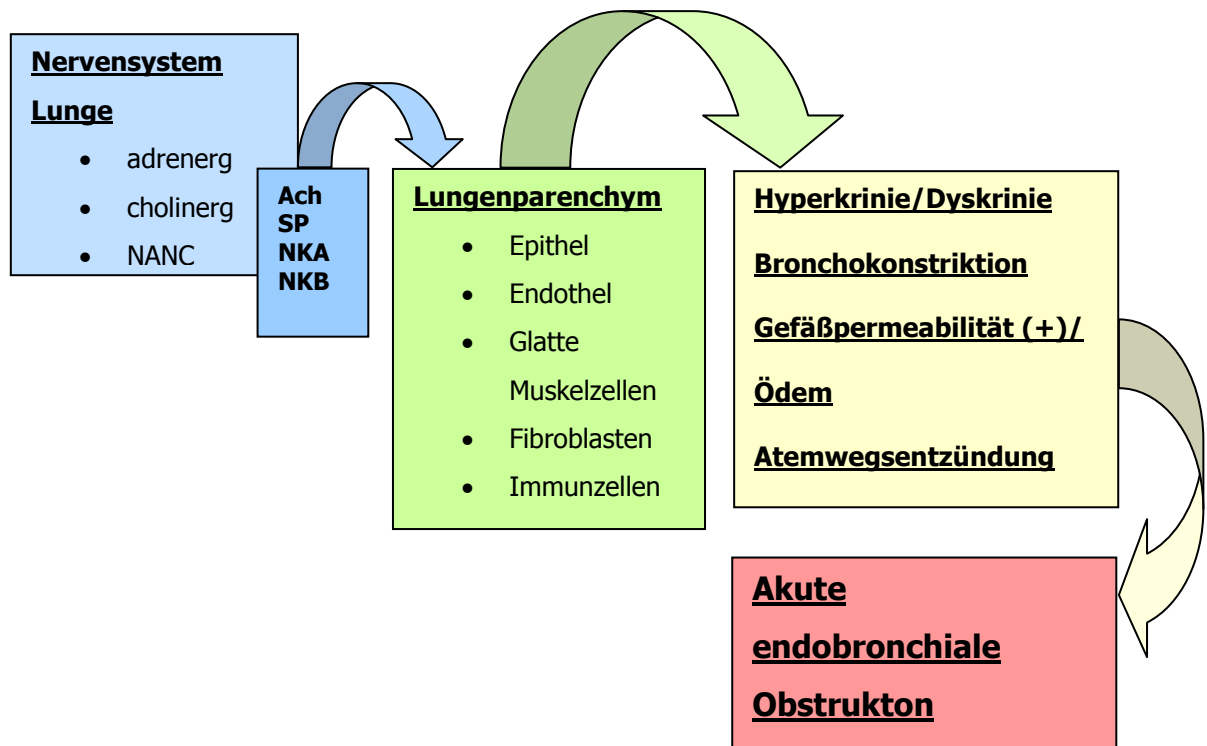


Abb. 7: Das Konzept der „neurogenen Entzündung“ [147, 159]. [Abkürzungen: Ach – Acetylcholin, SP – Substanz P, NKA – Neurokinin A, NKB – Neurokinin B, NANC – nicht-adrenerg-nicht-cholinerg].

1. 3. 1. 2 Neurotrophine und neuronale Plastizität

Qualitative und quantitative Veränderungen in der funktionellen Aktivität von viscerosensiblen Nervenzellen tragen maßgeblich zur Pathogenese des allergischen Asthmas bei. Diese werden unter dem Begriff der „neuronalen Plastizität“ zusammengefasst und beinhalten die Modulation der sensiblen Innervation sowie der neuronalen Sensitivität [116, 181, 219]. Als Mechanismen kommen hierfür eine Erniedrigung des Schwellenpotentials, eine Veränderung der Informationsverarbeitung sowie eine Veränderung in der Neurotransmitter-Synthese in Frage.

Neben den Zytokinen weiß man von den Neurotrophinen, dass sie neuronale Funktionen beeinflussen können [20, 42, 43]. So konnte man zeigen, dass NGF über eine Hochregulation der Synthese von Substanz P in sensiblen Nervenzellen zur bronchialen Hyperreaktivität beim allergischen Asthma beiträgt und dieser Effekt mittels des spezifischen NK-1 Rezeptorantagonisten *SR 140333* geblockt werden kann.

In Meerschweinchen und Mäusen induzierte intratracheal injiziertes NGF die Produktion von Substanz P in mechanosensitiven A δ -Fasern, die dieses Peptid sonst unter physiologischen Bedingungen nicht produzieren [45]. Neben dieser Fähigkeit der Stimulation der Tachykininsynthese in mechanosensitiven Nervenzellen kann NGF auch über eine vermehrte Freisetzung von präformierter Substanz P aus Nervenendigungen zu einer Steigerung der tachykininergen Aktivität innerhalb der Atemwege beitragen [43]. Diese Steigerung ist vermutlich für die überschüssige Reflexantwort auf harmlose Stimuli, wie sie im Rahmen der bronchialen Hyperreaktivität stattfindet, mitverantwortlich.

Die Tatsache, dass die Atemwege von Allergen-sensitisierten Mäuse eine im Vgl. zur Kontrollgruppe gesteigerte Antwort auf die Applikation von Methacholin, einem M₃-Agonisten, aufweisen, legt die Vermutung nahe, dass in Analogie zum sensiblen System auch das cholinerge System im Rahmen einer chronischen Entzündung einer Plastizität unterliegt [91]. Während ein direkter Einfluss von Neurotrophinen hierauf eher unwahrscheinlich zu sein scheint, könnten Neurotrophine indirekt, über eine Veränderung der sensiblen Innervation die Funktion cholinergischer Nerven beeinflussen [Abb. 8].

1. 3. 1. 3 Wirkung der Neurotrophine im Immunsystem

Aufgrund einer nachgewiesenen Expression von Neurotrophinen und ihrer Rezeptoren im Knochenmark und in Stromazellen des Thymus geht man davon aus, dass Neurotrophine u. a. auch eine Funktion bei der Differenzierung von Immunzellen ausüben [196]. Diese Annahme wird durch die Beobachtung untermauert, dass Neurotrophine im fötalen Knochenmark stärker transkribiert werden als in reiferen Wachstumsstadien und dass die Expression des trkB-Rezeptors in T-Lymphozyten negativ mit ihrem Reifestadium korreliert.

Im Zuge neuer Erkenntnisse weiß man, dass Neurotrophine auch auf die Aktivität des bereits entwickelten Immunsystems Einfluss ausüben können und somit eine immunmodulatorische Potenz besitzen. Für NGF konnte beispielsweise eine Funktion als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Mastzellen und basophile Granulozyten nachgewiesen werden [8, 17]. Zusätzlich führte die Anwesenheit des

Neurotrophins zu einer beschleunigten Degranulation dieser Zellen [65, 173]. NGF ist des weiteren imstande, Mastzellen, eosinophile Granulozyten und Makrophage zu aktivieren, die Synthese von Zytokinen zu steigern, [9, 128] die Proliferation von B- und T-Lymphozyten zu vermitteln und die Differenzierung von aktivierten B-Lymphozyten in Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen zu induzieren [195, 196]. Zudem steigerte NGF in einem murinen Asthmamodell die Synthese von T_H2-Zytokinen und IgE [1, 196].

Während sich zahlreiche Studien hauptsächlich mit der Wirkung des NGF auf das Immunsystem befassen, sind die Interaktionen zwischen den übrigen Mitgliedern der Neurotrophinfamilie und des Immunsystems noch weitgehend unerforscht. Diesbezüglich vorhandenen Daten implizieren jedoch, dass die verschiedenen Neurotrophine jeweils unterschiedliche Funktionen von Immunzellen beeinflussen. Beispielsweise konnte in eosinophilen Granulozyten gezeigt werden, dass lediglich NGF die Synthese von IL-4 steigert, während BDNF und NT-3 die Freisetzung des eosinophilen Proteins X (EPX) verstärken [135].

Zusammenfassend wird deutlich, dass Neurotrophine maßgeblich an Veränderungen der Gewebsverteilung und der biologischen Funktion (i. S. der Zelldifferenzierung, Empfindlichkeit gegenüber aktivierender Stimuli sowie Synthese und Sekretion von Mediatoren) von Immunzellen beteiligt sind. Diese immunmodulatorische Eigenschaft der Neurotrophine kommt insbesondere bei der Pathogenese des allergischen Asthmas zum Tragen [**Abb. 8**].

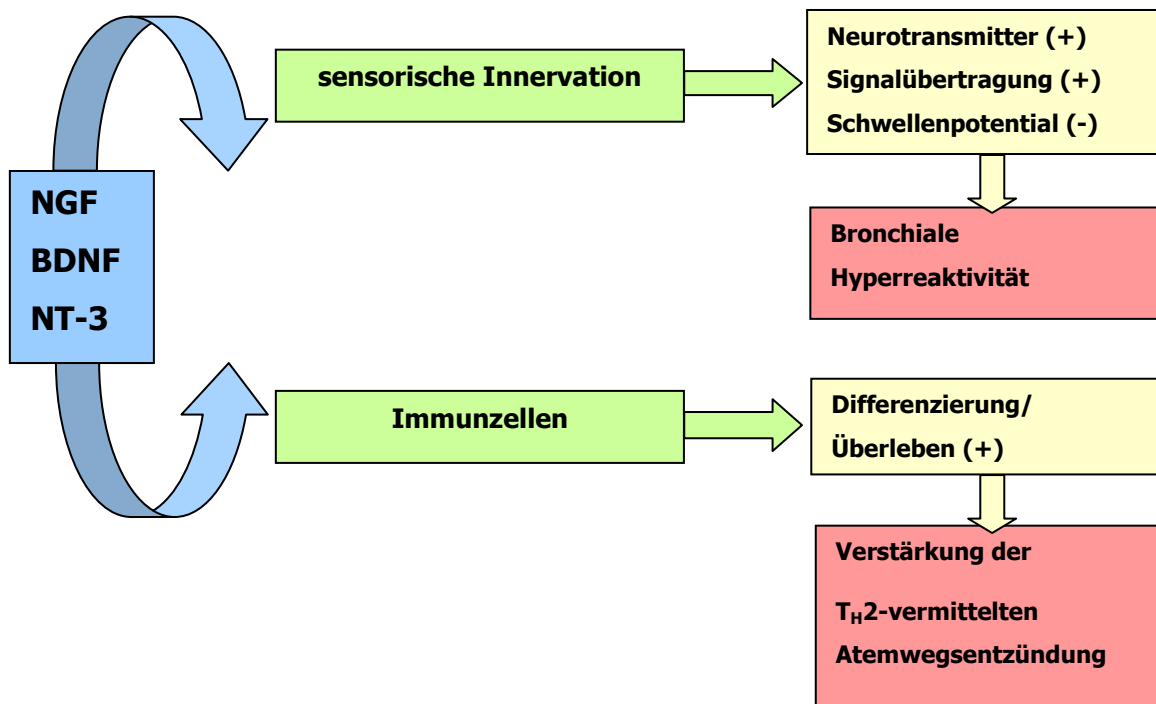


Abb. 8: Rolle der Neurotrophie in der Pathogenese des allergischen Asthmas [¹³⁴].

1. 4 Lungenepithelzellen

Als direkte Grenzschicht zur inhalierten Luft stellt das Lungenepithel die initiale Abwehrzone gegen inhalierte exogene Stoffe dar. Durch seine Fähigkeit zur *mukoziliären Clearance* und der Sekretion von protektiven Mediatoren, wie z. B. antibakteriellen Substanzen (Laktoferrin, Lysozym), Anti-Proteasen (α 1-Proteaseinhibitor, α 1-Antichymotrypsin, α 2-Makroglobulin und Gewebsinhibitoren von Metallproteasen) und Anti-Oxidantien (Superoxid-Dismutase, Katalase, Glutathion) stellt das Lungenepithel einen Teil des unspezifischen Immunsystems dar [¹⁶⁵]. Unterstützung bei der Wirtsabwehr findet das Lungenepithel durch zahlreiche dendritische Zellen und Makrophagen, die ein transepithelial interagierendes Zellnetzwerk bilden und als antigenpräsentierende Zellen (APC) eingedrungene Fremdantigene erkennen und über die Initiierung spezifischer Immunreaktionen ihre wirkungsvolle Beseitigung einleiten [^{166, 167}].

Über Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. dem *intracellular adhesion molecule* (ICAM)-1) und Sekretion zahlreicher Zytokine (u. a. $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 und GM-CSF) und Chemokine (z. B. dem *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1) nimmt das Lungenepithel zudem aktiv an der Regulation von Entzündungs- und Immunreaktionen innerhalb der Lunge teil [33, 201].

1. 4. 1 Rolle des Lungenepithels in der Pathogenese des allergischen Asthmas

Aktuellen Erkenntnissen nach handelt es sich im Rahmen des allergischen Asthmas um ein strukturell sowie funktionell defektes Lungenepithel, das über eine pathologische Reaktion auf inhalierte Allergene und Schadstoffe eine rege Kommunikation zwischen dem Lungenepithel, dem darunterliegenden Mesenchym und Immunzellen aufrechterhält [36, 77].

Eine gestörte physikalische Schutzfunktion des Lungenepithels mit Unterbrechung der *tight junctions* (Zonulae occludentes), wie sie im Rahmen des Asthmas und insbesondere nach Exposition gegenüber Allergenen und Tabakrauch sowie bei einer Infektion mit Rhinoviren vorkommt, erleichtert hierbei den Durchtritt für inhalierte Stoffe in das Lungengewebe und begünstigt somit die anschließende Interaktion mit Immunzellen [77]. Zu den funktionellen Defiziten des Lungenepithels zählen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress sowie eine eingeschränkte Fähigkeit zur Synthese von IFN β und IFN γ bei Virus-Infektionen, die zusammengekommen einen vorzeitigen Zelltod bedingen [77, 201].

Die im Rahmen des allergischen Asthmas beschriebenen chronischen Entzündungsreaktionen lassen sich somit zusammen mit dem postulierten chronischen Wund-szenario, das sich aus wiederholter Gewebsschädigung durch Umweltstoffe und mangelhaften Reparaturmechanismen des Lungengewebes zusammensetzt, u. a. auf ein defektes Lungenepithel zurückführen [180].

Wie bereits erwähnt, ist das allergische Asthma durch eine von Typ 2 T-Helferzellen ($\text{T}_{\text{H}2}$)-vermittelte Immunreaktion charakterisiert [130]. Das Zytokin *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) ist imstande, in dendritischen Zellen die Expression der ko-

stimulatorischen Moleküle OX40, CD40 und CD80 zu steigern und somit die Polarisation von T-Helferzellen zum T_H2-Phänotyp zu erleichtern. Zusätzlich vermag TSLP, unabhängig von T-Zellen, über eine direkte Interaktion mit Mastzellen die Produktion von sog. T_H2-Zytokinen zu initiieren [71, 83, 202]. Interessanterweise führt innerhalb des Lungenepithels die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) durch verschiedene funktionale Bestandteile von Viren, Bakterien und Pilzen zu einer Sekretion von TSLP (TLR2, TLR3) bzw. einer NF-κB-vermittelten Stimulation der Transkription des TSLP-Gens (TLR8, TLR9) [78, 109].

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Synthese von TSLP neben der o. g. TLR-vermittelten Weise auch durch proinflammatorische Zytokine (TNFα, IL-1α) und die sog. T_H2-Zytokine (IL-4 und IL-13) induziert werden kann [15]. Die Funktion des TSLP als Vermittler zwischen aktiviertem Lungenepithel und T_H2-vermittelter Immunreaktion wird in **Abb. 9** zusammengefasst.

Aus den o. g. Erkenntnissen lässt sich schlussfolgern, dass beim allergischen Asthma die initialen Entzündungsereignisse bereits auf epithelialer Ebene durch antigen-präsentierende Zellen, hier insbesondere durch die dendritischen Zellen, initiiert werden. Als Risikofaktoren spielen hierbei die frühzeitige Exposition gegenüber Schadstoffen wie beispielsweise Tabakrauch, die Prädisposition für atopische Erkrankungen sowie in besonderem Maße Infekte mit Rhinoviren im frühen Kindesalter eine entscheidende Rolle [7, 44]. Über eine Schädigung des jungen Lungenepithels kommt es hierbei über eine epitheliale Synthese von TSLP zur vorzeitigen Reifung der dendritischen Zellen mit konsekutiver Begünstigung einer T_H2-Immunantwort auf das penetrierende Antigen.

Ein strukturell sowie funktionell defizitäres Lungenepithel würde somit die schädigenden Eigenschaften von Rhinoviren und inhalierter Partikel begünstigen und folglich optimale Bedingungen für eine allergische Sensibilisierung innerhalb der Atemwege schaffen, die letztlich in der Entwicklung des allergischen Asthmas mündet.

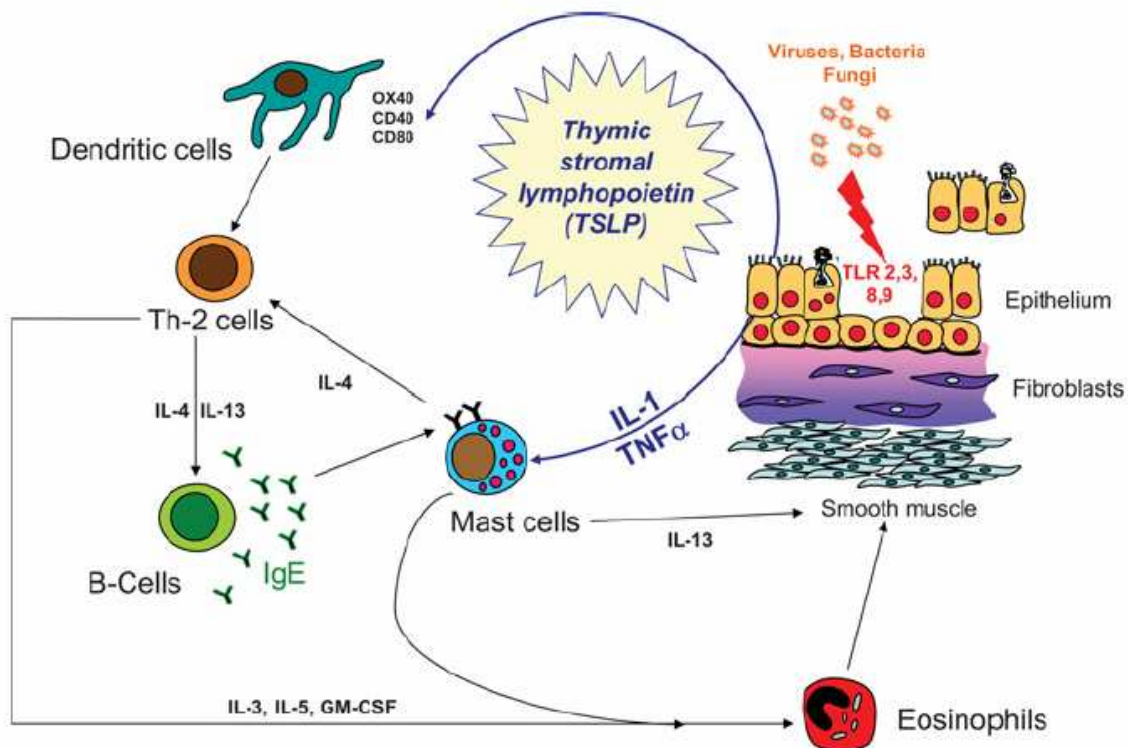


Abb. 9: *Rolle des TSLP als Vermittler zwischen aktiviertem Lungenepithel und T_H2 -vermittelter Immunantwort.* Über eine Interaktion mit dendritischen Zellen bewirkt TSLP eine Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle OX40, CD40 und CD80 und erleichtert somit die Polarisation der T-Helferzellen zum T_H2 -Phänotyp. T_H2 leiten anschließend über eine Induktion von IgE, Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und Aktivierung von Mastzellen die allergische Entzündungsreaktion herbei [78].

1. 4. 1. 1 Reparaturmechanismus des Lungenepithels im Rahmen des allergischen Asthmas

Die Herstellung einer physikalischen, chemischen sowie immunologischen Barriere gegenüber inhalierter Partikel ist grundlegend für den Erhalt der Gewebshomeostase und stellt eines der Hauptaufgaben des Lungenepithels dar. Im Falle einer Beeinträchtigung der o. g. Schutzfunktion des Lungenepithels wird als nächstes die immunologische Abwehr aktiviert mit nachgeschalteter Entzündungsreaktion. Bei chronischer Aktivierung fällt letztere pathologisch aus. Daher ist eine rasche Wiederherstellung der Integrität des Lungenepithels für den Erhalt der Gewebshomeostase unabdingbar [34].

Der Prozess der Wiederherstellung ist komplex und beinhaltet die Interaktion zwischen Initiationsfaktoren, Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, strukturellen Komponenten des Lungenparenchyms sowie verschiedener Signalkaskaden. Grob vereinfacht lässt er sich in zwei Phasen gliedern:

Zunächst kommt es im Rahmen der Schädigung des Epithels und der anschließenden Entzündungsreaktion zur Freisetzung einer breiten Palette an löslichen Faktoren aus Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, den beschädigten und benachbarten Epithelzellen sowie der darunterliegenden Matrix. Diese beinhalten Wachstumsfaktoren, Chemokine, Interleukine, Prostaglandine sowie Bestandteile der Extrazellulärmatrix (ECM). Bei den Wachstumsfaktoren handelt es sich hauptsächlich um Mitglieder der *epidermal growth factor* (EGF) Familie (EGF, TGF- α und - β) sowie der *fibroblast growth factor* (FGF) Familie (FGF-10, KGF, HGF) [34, 36, 199, 200]. Hierunter kommt es innerhalb der ersten 12-24 Std. nach Schädigung des Lungenepithels zu einer Wanderung und Verteilung von benachbarten Epithelzellen zwecks Bedeckung der freiliegenden Oberfläche und Herstellung einer temporären Barriere. Zuvor durchlaufen die differenzierten Epithelzellen in Anwesenheit der o. g. Wachstumsfaktoren, insbesondere dem *transforming growth factor* (TGF)- β , ähnlich der Phase der Embryonalentwicklung einen Wandel hin zu Fibroblasten und Myofibroblasten (EMT; *epitheliale mesenchymale Transition*), durch den sie über Auflösung ihrer Zellkontakte und Herabregulierung ihrer Adhäsionsmoleküle (wie z. B. e-Cadherin) zur Migration befähigt werden. Zudem führt die EMT zu einer gesteigerten Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Bestandteilen der ECM [205]. Die Zellwanderung in die Wundfläche erfolgt hierbei entsprechend einer amöboiden Bewegung mit Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien, die über Interaktionen mit Bestandteilen der ECM, wie z. B. dem Fibronectin und am Wundrand freiliegende Aktin-Bündel, die Bewegungsrichtung festlegen [161].

Die anschließende Phase beinhaltet die Migration, Proliferation und Differenzierung von epithelialen Vorläuferzellen zur Wiederherstellung der Zellzahl und Funktion des Lungenepithels. Im Bereich der distalen Atemwege (*Bronchioli terminales, respiratorii* und *Ductus alveolares*) nimmt man an, dass die Surfactantproteine-sezernierenden, zilienlosen Clara-Zellen fakultativen Vorläuferzellen repräsentieren und im Falle einer Epithelschädigung zur Proliferation und Differenzierung in zilientragende Epithelzellen angeregt werden [92, 175]. Auf Alveolarebene hingegen werden die kubischen

Pneumozyten Typ II als fakultative Vorläuferzellen diskutiert, die imstande sind nicht nur ihren eigenen Bestand, sondern auch den an Pneumozyten Typ I zu regenerieren [34, 106]. Einigen Studien zufolge, werden infolge einer Epithelschädigung auch Stammzellen aus dem Knochenmark in das Lungengewebe rekrutiert, wo sie anschließend zu Epithelzellen reifen [97]. Die Phase der Proliferation und Differenzierung der epithelialen Vorläuferzellen beginnt ca. 15-24 Std. nach Schädigung des Epithels und dauert Tage bis Wochen an. Letztlich mag die Wiederherstellung des Flimmerepithels mehrere Wochen betragen.

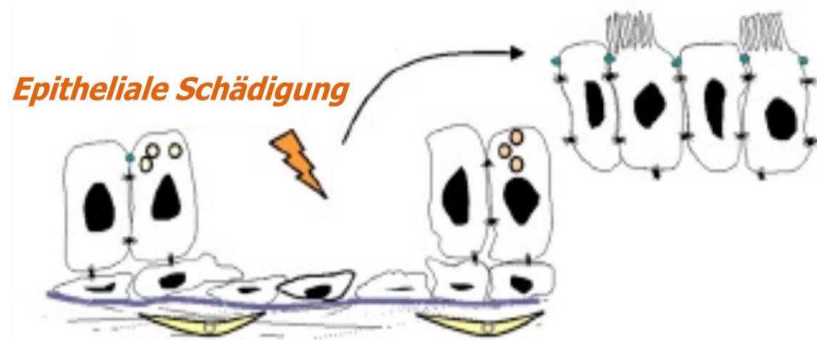
Die angeführten Zeitangaben wurden anhand von Untersuchungen an Atemwegsepithelzellen der Trachea von Meerschweinchen und Ratten gewonnen und dienen lediglich der groben Orientierung über die zeitlichen Zusammenhänge der jeweiligen Reparaturschritte, zumal derzeit keine Daten über den zeitlichen Ablauf der Wiederherstellungsprozesse auf alveolarer Ebene vorliegen [34].

Parallel zur Aktivierung des Lungenepithels reagiert die angrenzende Schicht von Fibroblasten auf die epitheliale Schädigung mit einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung zu Myofibroblasten. Zusammen mit der Synthese und Ablagerung einer provisorischen Matrix tragen sie zur Versiegelung der temporären Schutzschicht bei [203, 209]. Sobald die Schutzschicht gebildet worden ist, kommt es zwecks Ausgleichs des stattgefundenen Zellverlustes zur Zellteilung unter den Epithelzellen mit anschließender Differenzierung. Letztere beinhaltet als Initialschritt die Differenzierung zu schleimsezernierenden Becherzellen zur Wiederherstellung der sekretorischen Funktion des Epithels als zusätzlicher Schutz für die Atemwege und wird gefolgt von der Ziliogenese zur Herstellung der *mukoziliären Clearance*.

Sobald das Epithel seine normale Funktion zurückgewonnen hat, wird zur Wiederherstellung der normalen Gewebsstruktur die provisorische Matrix degradiert und abgebaut. Gleichzeitig wird über die Einleitung der Apoptose von Myofibroblasten die ursprüngliche Anzahl der submukös lokalisierten Fibroblasten wiederhergestellt [36].

Eine Zusammenfassung der jeweiligen Schritte des epithelialen Reparaturmechanismus gibt **Abb. 10** wieder.

Schädigung



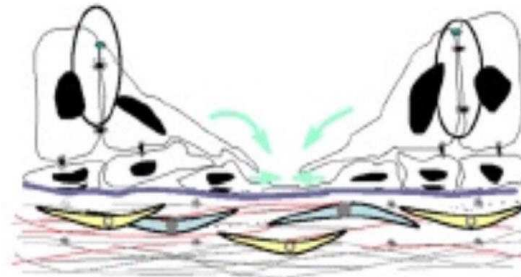
Initiale Antwort

- Zellmigration

MMPs, Kollagen (+),
interzelluläre Kontakte (-)

- Bildung einer provisorischen Schutzschicht

Proliferation der Fibroblasten
Aktivierung der Myofibroblasten



Konsolidierungsphase

- Wiederherstellung der ursprünglichen Gewebsstruktur

Reorganisation der
Extrazellulärmatrix,
Apoptose der
Myofibroblasten,

- Proliferations- und Reifungsphase

Differenzierung der epithelialen
Vorläuferzellen,
Schleimsekretion
Ziliogenese

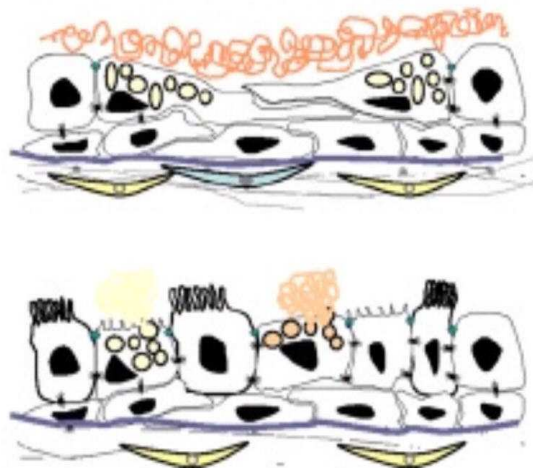


Abb. 10: Reparaturmechanismus des Lungenepithels [modifiziert nach ³⁶].

Neuen Erkenntnissen nach weist beim allergischen Asthma das Lungenepithel einen fehlregulierten Reparaturvorgang unter wiederholter Exposition gegenüber Allergenen und anderen Umweltschadstoffen auf. Die Fehlregulation beinhaltet eine epitheliale Überexpression des *epidermal growth factor receptor* (EGFR), eine verminderte Expression von Proliferationsmarkern (z. B. Ki67 und *proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) sowie erhöhte Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21waf [^{34, 36, 78, 199}].

Zusammengenommen führen o. g. Bedingungen zu einer eingeschränkten und protrahierten Reparaturfähigkeit des Lungenepithels und erhöhen wiederum seine Anfälligkeit für Schädigungen durch Allergene und Umweltschadstoffe. Zudem führt die im Rahmen der chronischen Epithelschädigung dauerhaft gesteigerte Expression von TGF- β zu einer überschießenden EMT mit extensiver Synthese und Ablagerung von Proteinen der ECM. Letztere bedingt über eine Fibrose der Atemwege die progressive Atemwegsobstruktion mit eingeschränkter bronchokonstriktorischer und –dilatativer Reaktion, wie sie im Rahmen der chronischen Verläufe des allergischen Asthmas beobachtet wird [78, 209].

2 ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN

Die Bedeutung der Neurotrophine für die Entwicklung, Differenzierung, Funktion und das Überleben von Nervenzellen des zentralen sowie peripheren Nervensystems ist unumstritten.

Neuen Erkenntnissen nach, üben Neurotrophine auch außerhalb des Nervensystems in verschiedenen Geweben wichtige Funktionen aus. Besondere Erwähnung verdient hierbei ihre Beteiligung an der Reifung und Regulation des Immunsystems. Somit dürften sie als Signalmoleküle bei der Regulation von Wechselwirkungen zwischen dem Nerven- und Immunsystem eine besondere Rolle spielen. Es wird davon ausgegangen, dass bei der Pathogenese des allergischen Asthmas u. a. eine Störung der Regulation der o. g. Wechselwirkungen vorliegt. Für eine Beteiligung der Neurotrophine an den pathophysiologischen Vorgängen spricht der Nachweis erhöhter Konzentrationen an zirkulierendem und lokalem NGF, BDNF sowie NT-3, die durch Provokation mit Allergenen zusätzlich gesteigert werden können.

Neben den aktivierten Immunzellen, die das Lungengewebe im Rahmen der Entzündung infiltrieren, konnten mittlerweile auch Strukturzellen der Lunge, wie beispielsweise Fibroblasten und glatte Muskelzellen, als Quelle für Neurotrophine identifiziert werden. Interessanterweise exprimieren letztere auch unter physiologischen Bedingungen Neurotrophine und implizieren somit eine Beteiligung der

Neurotrophine auch an physiologischen Vorgängen innerhalb des Lungenparenchyms.

Inwiefern die Biologie des Lungenepithels einem Einfluss seitens der Neurotrophine unterliegt und ob das Epithel u. a. auch durch Expression von Neurotrophinen an der komplexen Dysregulation während des Entzündungsgeschehens beteiligt ist, ist derzeit nicht hinreichend untersucht worden.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag geleistet werden zur Aufklärung der Funktion von Neurotrophinen innerhalb des Lungenepithels. Darüber hinaus galt es, die Beteiligung des Lungenepithels an Neurotrophin-vermittelten Signalwegen zwischen den verschiedenen Zellen innerhalb des Lungenparenchyms beim allergischen Asthma zu durchleuchten.

Ausgehend von einer allgemeinen Rolle der Neurotrophine als Wachstums- und Überlebensfaktoren wurde ein Schwerpunkt der Arbeit auf die Untersuchung eines möglichen Einflusses von Neurotrophinen auf das Wachstums- und Proliferationsverhalten von Zellen des Lungenepithels gesetzt. Des Weiteren wurde bei postulierter Neurotrophinexpression durch Epithelzellen das Sekretionsverhalten unter pro- sowie antiinflammatorischen Bedingungen untersucht.

Folgende Fragen sollten somit beantwortet werden:

- Sind Zellen des Lungenepithels in der Lage Neurotrophine zu sezernieren?
- Üben pro-/antiinflammatorische Zytokine einen Einfluss auf die Expression der Neurotrophine in Zellen des Lungenepithels aus?
- Exprimieren Zellen des Lungenepithels Rezeptoren für Neurotrophine?
- Erfolgt die Expression der Neurotrophine/Neutrophin-Rezeptoren in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium des Epithels?
- Unterliegt die Proliferation des Epithels einer Regulation durch bestimmte Neurotrophine?

Zur Klärung dieser Fragen wurde die Expression der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren am Model der murinen Lungenepithelzelllinie LA-4 untersucht.

3 MATERIALIEN

3. 1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden, sofern im Text der vorliegenden Arbeit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen.

3. 1. 1 Bestandteile des Kulturmediums

| | | |
|---|--|---------------------------|
| F-12K Nutrient Mixture, Kaighn's Modification 1x, liquid | Gibco [®] , Deutschland | Invitrogen, Karlsruhe, |
| FCS | PAA Laboratories, Pasching, Österreich | |
| L-Glutamin | PAA Laboratories, Pasching, Österreich | |
| Penicillin/Streptomycin | PAA Laboratories, Pasching, Österreich | |

3. 1. 2 Sonstige Lösungen

| | |
|--|--|
| Trypsin-EDTA | PAA Laboratories, Pasching, Österreich |
| Dulbecco's <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline | PAA Laboratories, Pasching, Österreich |

3. 1. 3 Zytokine

| Faktoren | Spezies | Quelle | |
|-----------------|----------------|---------------|-------------------------------|
| TNF α | Maus | E. coli | Cell Concepts, Umkirch |
| IL-1 β | Maus | E. coli | Cell Concepts, Umkirch |
| IL-4 | Maus | E. coli | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| IL-5 | Maus | E. coli | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| IL-13 | Maus | E. coli | Cell Concepts, Umkirch |
| INF γ | Maus | E. coli | Cell Concepts, Umkirch |

3. 1. 4 Neurotrophine

| Faktoren | Spezies | Quelle | |
|----------|---------|---------|----------------------------|
| BDNF | Mensch | E. coli | AL-ImmunoTools, Friesoythe |
| NGF | Mensch | CHO | AL-ImmunoTools, Friesoythe |

3. 1. 5 Antikörper

| Antikörper | Spezies | Quelle | |
|------------|---------|-----------|--------------------------|
| anti-BDNF | Mensch | Kaninchen | PeptoTech EC, London, UK |
| anti-NGF | Mensch | Kaninchen | PeptoTech EC, London, UK |

3. 1. 6 Oligonukleotide

| Name | Sequenz | Produktlänge |
|--------------------|-------------------------------------|--------------|
| BDNF | s 5'-AGG ACG CGG ACT TGT ACA CT-3' | 279 bp |
| | as 5'-TCA GTT GGC CTT TGG ATA CC-3' | |
| NGF | s 5'-GTG TCA GTG TGT GGG TTG GA-3' | 217 bp |
| | as 5'-GCC TTG ACG AAG GTG TGA GT-3' | |
| NT-3 | s 5'-CTG AGT GAC AGC ACC CCT TT-3' | 216 bp |
| | as 5'-CAG CAC TGT GAC CTG GTG TC-3' | |
| trkB gp95 | s 5'-CGA ACC TGC AGA TAC CCA AT-3' | 161 bp |
| | as 5'-TCA TGT GCT TGG AAA CCA AA-3' | |
| trkB gp145 | s 5'-AAC CTG CTG GTG AAA ATT GG-3' | 196 bp |
| | as 5'-TGC TTG CCG TAG GTG AAG AT-3' | |
| trkA | s 5'-AGG TCT TTC TCG CTG AGT GC-3' | 173 bp |
| | as 5'-GGT GCA GAC TCC AAA GAA GC-3' | |
| trkC | s 5'-GAA GGA GAC AAT GCC GTG AT-3' | 133 bp |
| | as 5'-TGG CAT GTA CAT TGG TCC AG-3' | |
| p75 ^{NTR} | s 5'-TTC TAG GGG TGT CCT TTG GA-3' | 174 bp |
| | as 5'-TCA CCA CGT CAG AGA ACG TA-3' | |

Alle Oligonukleotide wurden von metabion GmbH, Martinsried/München bezogen.

3. 2 Kits und Assaysysteme

| | |
|---|---------------------------------|
| BDNF E _{max} [®] ImmunoAssay System | Promega, Mannheim |
| NGF E _{max} [®] ImmunoAssay System | Promega, Mannheim |
| NT-3 E _{max} [®] ImmunoAssay System | Promega, Mannheim |
| NT-4 E _{max} [®] ImmunoAssay System | Promega, Mannheim |
| BrdU Cell Proliferation ELISA | Roche Diagnostics, Mannheim |
| CellTiter 96 [®] AQ _{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay | Promega, Mannheim |
| RNeasy Mini Kit | QIAGEN, Hilden |
| DNA-free [™] | Ambion Ltd., Cambridgeshire, UK |
| SuperScript [™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR | Invitrogen, Karlsruhe |
| REDTaq [™] ReadyMix [™] PCR Reaction Mix | Sigma-Aldrich, Seelze |

3. 3 Gefäße und Verbrauchsmaterial

| | |
|--|--------------------------------------|
| BD Falcon [™] Zellkultur-Inserts für 6-Well Platten (0.4 µm Poren) | Becton-Dickinson, New Jersey, USA |
| 6/12/24-Well Zellkultur-Platten | NUNC, Roskilde, Dänemark |
| Zellkulturflaschen 25 / 75 cm ² | NUNC, Roskilde, Dänemark |
| 96-MicroWell Immuno-Platten | NUNC, Roskilde, Dänemark |
| 96-Well Zellkultur Mikroplatte, F-Boden | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| PP-Schraubverschluss Röhrchen, 50 ml | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Reagenz- und Zentrifugenröhre 15 ml | SARSTEDT, Nümbrecht |
| Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| sterile serologische Pipetten (25 ml/10 ml/5 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Sterile Filter-Tips mit „Sealing-Filter“ | Biozym Scientific, Oldendorf |

3. 4 Geräte

| | | |
|--------------------------------|---|--|
| CO ₂ -Inkubator | HERAcell [®] | Heraeus (Kendro), Karlsruhe |
| Heizblock | Thermostat HBT-1 | Heap Labor Consult, Bovenden |
| Mikroliterzentrifuge | Biofuge fresco | Heraeus (Kendro), Karlsruhe |
| Mikroplatten Reader | GENios | TECAN Deutschland, Crailsheim |
| Mikroskop | | |
| Photometer | GeneQuant II | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Schüttler | Ika MTS4 | Fa. Bachofer, Reutlingen |
| Sicherheitswerkbank | HERAsafe [®] HS | Heraeus (Kendro), Karlsruhe |
| Thermocycler | RoboCycler [®] 96 Gradient Cycler with Hot Top TRIO-Thermoblock | Stratagene, La Jolla, CA, USA Biometra, Göttingen |
| UV-Transilluminator | | MWG Biotech, Ebersberg |
| Wasseraufbereitungs- system | Milli Q | Millipore, Schwalbach |
| Wasserbad | Julabo R5 | JULABO, Seelbach |
| Zellzähler | CASY [®] Cell Counter + Analyser System Model TT | Schärfe System, Reutlingen |
| Zentrifuge | Megafuge 1.0R | Heraeus (Kendro), Karlsruhe |

3. 5 Zelllinie

| Zelltyp | Referenz | Beschreibung |
|----------------|-------------------------|--|
| LA-4 | ATCC, Manassas, VA, USA | urethaninduziertes Lungenadenom der Maus |

4 METHODEN

4. 1 Zellkultur

Zellkulturarbeiten wurden grundsätzlich an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle für Zellkulturzwecke verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Anwendung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

4. 1. 1 Kultivierung der LA-4 Zellen

Die Kultivierung der LA-4 Zellen erfolgte in einem F-12K Mediumgemisch mit Zusatz von 15% FCS, 1% L-Glutamin sowie 1% Penicillin/Streptomycin (im folgenden Medium genannt) in 75 cm²- Zellkulturflaschen bei 37 °C warmer, wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt. Ein Mediumwechsel erfolgte im Durchschnitt nach jedem zweiten Tag.

Passagieren

Bei Erreichen einer Konfluenzdichte von ca. 80% wurde die Zellpopulation im Verhältnis 1:3 geteilt. Hierbei wurde aus der 75 cm²- Zellkulturflasche das Medium abgesogen und die Zellschicht kurz mit Trypsin-EDTA durchspült, um jegliche Spuren vom im Serum enthaltenen Trypsin-Inhibitor zu entfernen. Nach Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA wurde die Zellkulturflasche unter einem Mikroskop betrachtet und der Zeitpunkt des Ablösens der adhärennten Zellen bestimmt. Den vollständig von der Flasche gelösten Zellen wurden anschließend 9 ml Medium zwecks Hemmung der Trypsinaktivität hinzugegeben, woraufhin die Zellsuspension in eine 15 ml Zentrifugenröhre überführt wurde. Nach erfolgter Zentrifugation bei 100 x g für 5 min und Absaugen des Überstandes erfolgte eine Resuspension der Zellen in frischem Medium mit anschließender Aufteilung auf drei, bereits mit Medium gefüllte 75 cm²- Zellkulturflaschen.

4. 2 Quantitative Proteinbestimmung mittels ELISA

Die quantitative Bestimmung der Neurotrophine erfolgte mit dem BDNF E_{max}[®] ImmunoAssay System, dem NGF E_{max}[®] ImmunoAssay System, dem NT-3 E_{max}[®] ImmunoAssay System und dem NT-4 E_{max}[®] ImmunoAssay System (Promega) laut Herstellerangaben.

Diesen Systemen liegt die Methode eines zweiseitigen *enzym-linked immunosorbent assays* (ELISA) zugrunde, die hier stellvertretend durch die Beschreibung der quantitativen NGF-Bestimmung kurz erläutert werden soll:

NGF E_{max}[®] ImmunoAssay System

96-Well Immunoplaten wurden mit polyklonalem anti-NGF Antikörper in Beschichtungspuffer (25mM Karbonat-Puffer, pH 9,7) beschichtet. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Platten in TBST-Waschpuffer (20mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween[®]20, pH 7,6) gewaschen und anschließend mit „Block and Sample“-Puffer über einen Zeitraum von einer Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss erfolgte ein weiterer Waschschrift, wonach die Zellüberstände und die NGF-Standards in die jeweiligen Wells pipettiert und für sechs Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Monoklonale anti-NGF Antikörper wurden nach vorangegangenem Waschvorgang für eine weitere Inkubation bei 4 °C über Nacht aufgetragen. Nach einem weitem Waschschrift wurde *horse-radish-peroxidase*-konjugiertes anti-Ratten IgG für einen Inkubationszeitraum von 2,5 Stunden bei Raumtemperatur hinzugefügt, gefolgt von einem letzten Waschvorgang mit anschließender 10-minütiger Inkubation mit dem Enzym-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin 0,02% und Hydrogenperoxid 0,01%). Die kolorimetrische Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Gabe von 1 M Salzsäure gestoppt und die optische Dichte bei 450nm bestimmt.

Diese Technik ermöglichte das Messen der NGF-Konzentration in einem Bereich von 7,8 bis 500 pg/ml.

4. 3 Proliferationsmessungen

Die Proliferationsmessung erfolgte mit Hilfe des CellTiter 96[®]AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assays (Promega) sowie des BrdU Cell Proliferation ELISAs (Roche). Beide Methoden werden im Folgenden kurz vorgestellt:

4. 3. 1 CellTiter 96[®]AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay

Zellen einer 96-Well Zellkulturplatte wurden hierbei mit einer Lösung aus Phenazin-Methosulfat und einer Tetrazolium-Verbindung [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, MTS] für einen Zeitraum von drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Reduktion der Tetrazolium-Verbindung durch Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen zu Formazan, das anschließend gelöst im Zellkulturmedium vorlag und dessen Absorption nach Ablauf der Inkubationszeit bei 490nm gemessen werden konnte.

Bei dieser Methode bestand eine direkte Proportionalität des quantitativ gemessenen Formazans zur Zahl der lebenden Zellen in Kultur.

4. 3. 2 BrdU Cell Proliferation ELISA

Zellen einer 96-Well Zellkulturplatte wurden bei dieser Methode zunächst für einen Zeitraum von 12 Stunden im Brutschrank bei 37 °C mit BrdU [5-Bromo-2'-Deoxyuridin] inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte in proliferierenden Zellen der Einbau des Pyrimidinanalogons BrdU anstelle von Thymidin in die DNA. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert, indem man die Wells mit der FixDenat-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubierte. Das in die neusynthetisierte DNA eingebaute BrdU wurde hierdurch für

die Bindung des anti-BrdU-POD Antikörpers zugänglich gemacht. Es folgte, nach Entfernung der FixDenat-Lösung, die Inkubation mit peroxidasekonjugiertem anti-BrdU für 90 min bei Raumtemperatur. Überschüssige Antikörper wurden im Anschluß durch einen Waschschrift entfernt und es folgte die Hinzugabe des Substrates [Tetramethyl-Benzidin, TMB]. Nach einer Inkubationszeit, die in Abhängigkeit einer für den photometrischen Nachweis ausreichenden Farbentwicklung zwischen 5 und 30 Minuten betrug, wurde die Reaktion durch Zugabe von einmolarer Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450nm gemessen.

4. 4 Molekularbiologische Untersuchungen

4. 4. 1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurde der RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN) verwendet. Bei dieser Methode wird die selektive Bindungseigenschaft von RNA an Kieselgel-Membranen mit der Mikrospin Technologie kombiniert. Die Anwendung folgte dem Spin-Protokoll des Herstellers. Alle Arbeitsschritte erfolgten mit RNase-freien Materialien und Lösungen.

Durch einen denaturierenden, Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen (GITC) Puffer wurden die Proben lysiert und alle RNAsen sofort und effektiv inaktiviert, wodurch eine Isolation intakter RNA möglich wurde. Nach Zugabe von Ethanol zwecks Verbesserung der Bindung der RNA and die Membran, wurden die Proben auf eine RNeasy Mini Säule gegeben, so dass nach verschiedenen Waschschriften bis zu 100 µg intakter RNA-Moleküle, deren Größe > 200 Nukleotide betrug, pro RNeasy Säule gewonnen werden konnten. Das bedeutet letztendlich auch, dass an der isolierten RNA-Menge der Anteil an RNA-Molekülen mit einer Größe <200 Nukleotide, wie z.B. 5.8S rRNA, 5S rRNA und tRNA, gering war. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

4. 4. 2 Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der extrahierten RNA erfolgte durch spektrophotometrische Messung bei 260 nm. Durch zusätzliches Messen der Absorption der in der Lösung befindlichen Proteine bei 280 nm erhielt man aus dem Quotienten 260/280 nm eine Aussage über den Reinheitsgrad der Präparation. Eine saubere Präparation sollte einen Quotient zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen.

4. 4. 3 DNA-Digestion

Da während einer RNA-Extraktion eine Kontamination der RNA-Proben mit DNA nicht ausgeschlossen werden kann, wurden die Proben einer Behandlung mit dem DNA-freeTM-Kit unterzogen, bei der Spuren von DNA durch eine rekombinante DNase entfernt wurden.

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers:

| | RNA-Probe |
|-------|---|
| + | 0,1 Volumen 10X DNase I Puffer |
| + | 1 µl DNase I |
| <hr/> | |
| | ⇒ Inkubation für 20 min bei 37 °C |
| + | 0,1 Volumen DNase Inaktivations Reagenz |
| <hr/> | |
| | ⇒ Inkubation für 2 min bei RT |
| | ⇒ 2 min bei 10.000 x g zentrifugieren |

4. 4. 4 Reverse Transkription

Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) aus der extrahierten RNA wurde das SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR verwendet.

RNA/Primer-Mixtur:

| | |
|---|-----------------------------------|
| | 0,5 µg total RNA |
| + | 0,5 µl Random Hexamere (50 ng/µl) |
| + | 0,5 µl 10 mM dNTP mix |
| + | RNase/DNase-freies Wasser |
| <hr/> | |
| <i>⇒ 5 min bei 65 °C, anschließend mind. 1 min lang auf Eis abkühlen lassen</i> | |

Reaktionsmischung:

| | |
|-------|---|
| | 2 µl 5X Puffer |
| + | 1 µl 0,1 M DTT |
| + | 0,5 µl RNaseOUT Recomb. Ribonuclease Inhibitor |
| <hr/> | |

Nach zweiminütiger Inkubation der RNA/Primer-Mixtur mit der Reaktionsmischung bei 25 °C, wurde 1 µl der SuperScript™ II RT in jeden Ansatz pipettiert und diese für weitere 10 min bei 25 °C inkubiert. Die Synthesereaktion wurde mit einer Inkubationszeit von 50 min bei 42 °C gestartet und durch anschließende Inkubation für 15 min bei 70 °C beendet. Zuletzt wurde zwecks Entfernung der RNA-Vorlagen 1µl RNase H in jeden Ansatz gegeben und diese im Anschluß für 20 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine 1:10 Verdünnung der cDNA Proben mit DNase-freiem Wasser. Die cDNA wurde bis zur PCR bei –20 °C gelagert.

4. 4. 5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Für die Amplifikation der gewünschten Genabschnitte wurde je PCR-Probe ein Endvolumen von 20 µl gewählt und enthielt folgende Zusammensetzung:

| | |
|--------|--------------------|
| 10 µl | 2X ReadyMix REDTaq |
| 0,5 µl | sense-Primer |
| 0,5 µl | antisense-Primer |
| 2 µl | cDNA |
| 7 µl | H ₂ O |

Die Reaktionsansätze wurden im Thermocycler in 45 Zyklen nach folgendem Profil inkubiert:

| | | | |
|-------------|--------------------------|-------|--------|
| Start | | 94 °C | 5 min |
| Zyklus 1-45 | Hitzenaturierung | 94 °C | 30 sec |
| | Anlagerung der Primer | 58 °C | 45 sec |
| | Elongation | 72 °C | 30 sec |
| | | | |
| Ende | | 72 °C | 5 min |

Da der verwendete Thermocycler einen heizbaren Deckel besaß, der ein Verdunsten des Ansatzes verhinderte, konnte auf eine Übersichtung der Ansätze mit Mineralöl verzichtet werden. Der Nachweis der entstandenen DNA-Fragmente erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung.

4. 4. 6 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 bis 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Zur Herstellung eines solchen Geles wurde eine entsprechende Menge Agarose eingewogen, mit 1x TAE-Puffer vermischt und durch Aufkochen schlierenfrei gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 40 °C wurden 2µl Ethidiumbromidlösung hinzugefügt, vermischt und in eine entsprechende Gelkammer gegossen, in der ein Gelkamm zur Taschenausformung steckte. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid wird DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht, da Ethidiumbromid zwischen die Basenpaare doppelsträngiger DNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Nachdem das Gel sich verfestigt hatte, wurde es mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Im Anschluß wurden die Proben sowie ein Marker in die Taschen gefüllt und die Elektrophorese der Fragmente bei 120 V für ca. eine Stunde durchgeführt. Die Auswertung des Gels erfolgte anschließend in einem UV-Transilluminator.

4. 5 Statistik

Bei den Experimenten sind die Messdaten als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelexperimenten angegeben.

Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem unpaarigen t-Test berechnet, wobei sich die Signifikanz auf die jeweils angegebene Positiv- bzw. Negativkontrolle bezieht. Dabei wurde $p < 0,05$ als signifikant betrachtet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der GraphPad PRISM Software, Version 4.01.

5 Ergebnisse

5.1 Sekretionsprofil von Neurotrophinen unter basalen Bedingungen

Um die Neurotrophine, die konstitutiv von LA-4 Zellen sezerniert werden, zu identifizieren und einen zeitlichen Verlauf ihres Sekretionsmusters zu untersuchen, wurde die Konzentration an BDNF, NGF, NT-3 sowie NT-4 aus Überständen von konfluent gewachsenen Populationen von LA-4 Zellen in Abständen von jeweils 24 Stunden ermittelt.

Hierfür wurde jeweils 1ml einer Zellsuspension mit einer Konzentration von ca. 2×10^5 Zellen/ml in jedes Well einer 24-Well Zellkulturplatte pipettiert. Nach Erreichen einer optisch erkennbaren Konfluenz innerhalb der Zellpopulationen, wurden Zellkulturüberstände in einem 24-stündigen Rhythmus abgenommen. Zuvor erfolgte ein letzter Wechsel des Mediums.

Die frisch entnommenen Zellkulturüberstände wurden kurz zentrifugiert, bevor die zellfreien Überstände bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden konnten. Die quantitative Bestimmung der Neurotrophine erfolgte mittels spezifischer ELISA Systeme.

Trotz längerer Kultivierung zeigten sich in den Zellüberständen keine Spuren von NT-3 bzw. NT-4 (nicht dargestellt), wohingegen bereits nach 24 Stunden hohe Spiegel an NGF und insbesondere BDNF nachweisbar waren [**Abb. 11**].

Abbildung 11 zeigt weiterhin, dass die Konzentrationen an NGF und BDNF in den Zellüberständen zunächst über Tage zunehmen, nach 96h Inkubationszeit ein Maximum erreichen (BDNF: $364,41\text{pg/ml} \pm 2,9\text{ SD}$; NGF: $100,99\text{pg/ml} \pm 0,2\text{ SD}$) und anschließend abnehmen.

Die nachgewiesene Proteinexpression von NGF und BDNF in den Zellüberständen von LA-4 Zellen korrespondiert mit den in Abschnitt 5.5 (S. 62) beschriebenen Beobachtungen über die Genexpression für Neurotrophine, die sich ebenfalls auf die alleinige Expression von mRNA für NGF und BDNF beschränkt [**Abb. 15**].

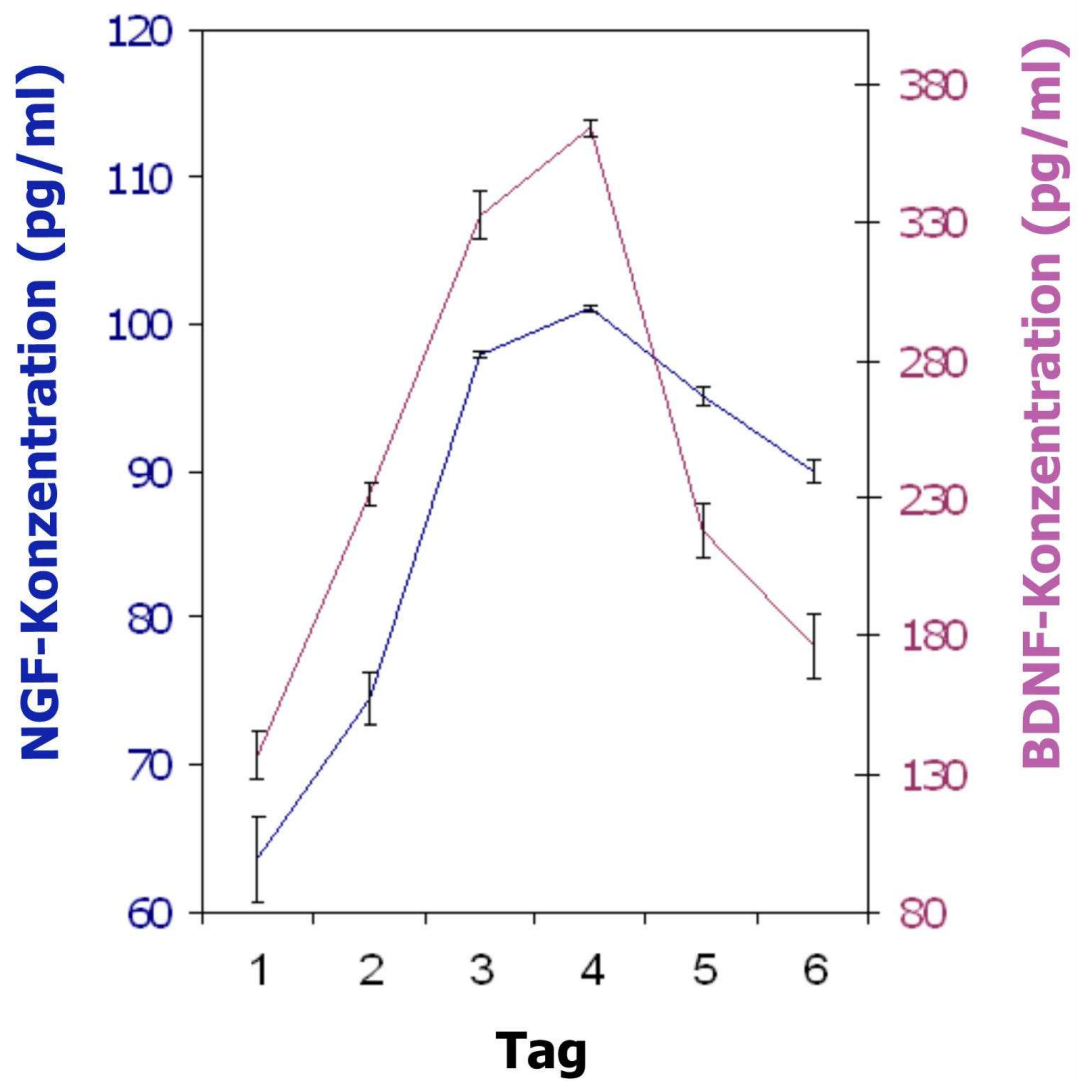


Abb. 11: Konstitutive Sekretion von NGF und BDNF in LA-4 Zellen über einen Zeitraum von 6 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Neurotrophinkonzentrationen \pm SD aus $n=3$ Experimenten mit 4-fachem Ansatz.

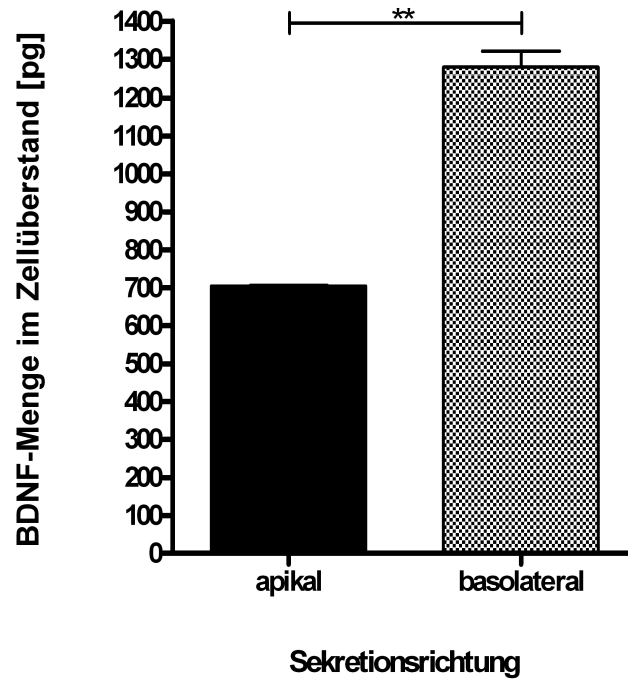
5. 2 Polarisierte Sekretion von NGF und BDNF

Zur Ermittlung der Sekretionsrichtung für NGF bzw. BDNF wurden die LA-4 Zellen zunächst als konfluentgewachsene Monolayer auf Zellkultur-Inserts mit einer semipermeablen Membran (Porengröße: 0,4µm) kultiviert.

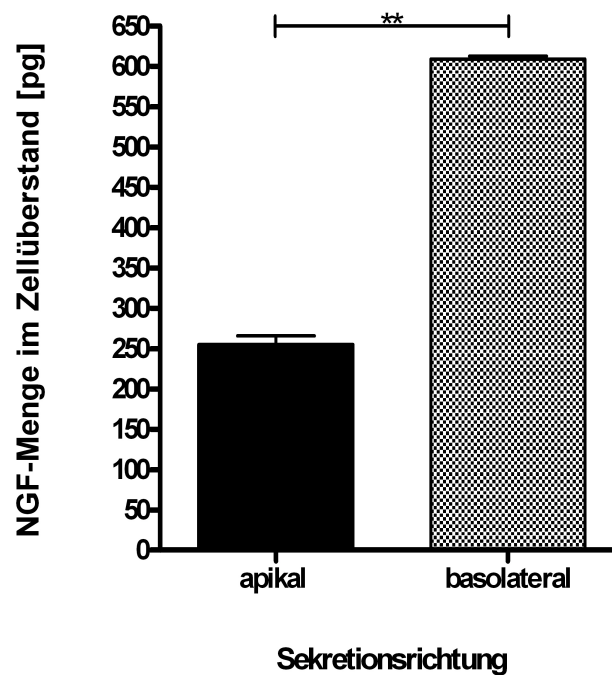
Hierfür wurden je 2ml einer Zellsuspension von 10^5 Zellen/ml auf den Boden von „umgedrehten“ Zellkultur-Inserts pipettiert. Nach optisch bestimmter Konfluenz der Zellen auf den Insert, die sich im Durchschnitt innerhalb von drei Tagen einstellte, wurden die Insert in Wells einer 6-Well-Platte gestellt, die zuvor mit 4 ml Medium gefüllt worden waren. Die Insert selbst wurden mit 2ml Medium gefüllt. Bei dieser Anordnung bildete das Medium innerhalb des Wells, in das die Zellpopulation hineinragte, das apikale Kompartiment wohingegen das Medium innerhalb des Insert das basolaterale Kompartiment repräsentierte.

Nach Verstreichen von 72 Stunden, wurden die Zellkulturüberstände aus beiden Kompartimenten entnommen und kurz zentrifugiert, bevor die zellfreien Überstände bei -20°C gelagert werden konnten.

Abbildung 12 zeigt, dass sowohl BDNF als auch NGF in beiden Kompartimenten nachweisbar waren. Im Hinblick auf die Gesamtmenge der sezernierten Neurotrophine zeigt sich, dass 65% des BDNF und 70% des NGF in das basolaterale Kompartiment sezerniert wurden (BDNF: 1279,26pg +/- 41,8 SD *basolateral* zu 704,22pg +/- 3,2 SD *apikal*; NGF: 609,18pg +/- 3,8 SD *basolateral* zu 255,03pg +/- 15,4 SD *apikal*).



a)



b)

Abb. 12: Polarität der Sekretion von BDNF **a)** bzw. NGF **b)** in LA-4 Zellen. Obwohl sich in beiden Kompartimenten (apikal/basolateral) Konzentrationen an BDNF und NGF nachweisen ließen, waren sie im basolateralen Kompartiment besonders hoch. Dargestellt sind die Mittelwerte der Neurotrophinmengen +/- SD aus n=2 Experimenten. **: $p < 0,01$.

5.3 Wachstumskinetik der LA-4 Zellen

Zur Untersuchung der Wachstumskinetik der LA-4 Zellen wurden in mehrere 25 cm² Zellkulturflaschen jeweils 1×10^5 Zellen ausgesät. In Abstand von 24 Stunden erfolgte die Bestimmung der Zellzahl jeweils einer Zellkulturflasche mittels Zellzählgerät. Bei Zellpopulationen, bei denen die Ermittlung der Zellzahl noch ausstand, wurde nach jeweils zwei Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt.

Die somit ermittelte Vermehrung der LA-4 Zellen in Kultur unterliegt einer logistischen Wachstumsfunktion [**Abb. 13**]; einer anfänglichen „lag-phase“ (die Zeit von der Beimpfung bis zum Beginn der ersten Zellteilungen) folgt die sogenannte „log-phase“ (die Phase der exponentiellen Vermehrung), die bei Erreichen der max. Konfluenzdichte in eine Stagnation des Wachstums übergeht.

Die Verdopplungszeit der LA-4 Zellen betrug während der „log-phase“ im Durchschnitt 24 Stunden.

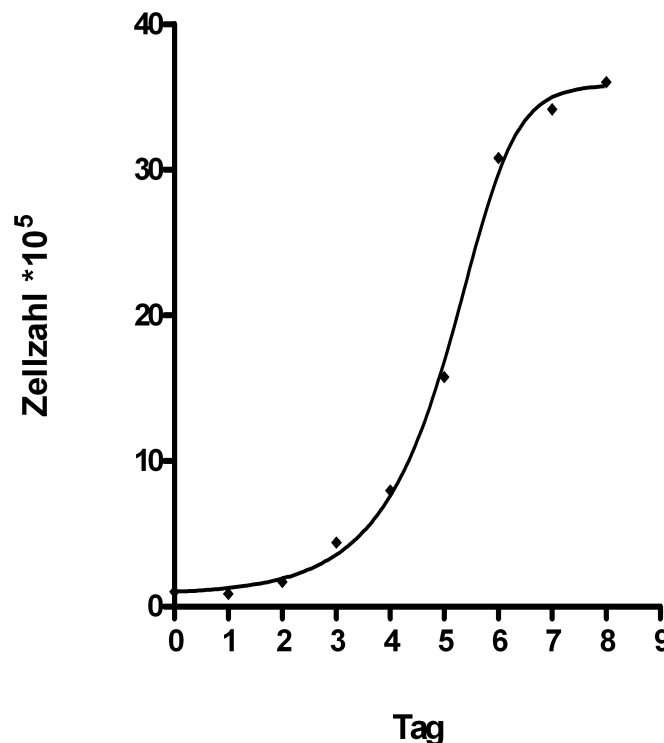


Abb. 13: Wachstumskinetik von LA-4 Zellen auf einer Fläche von 25 cm²

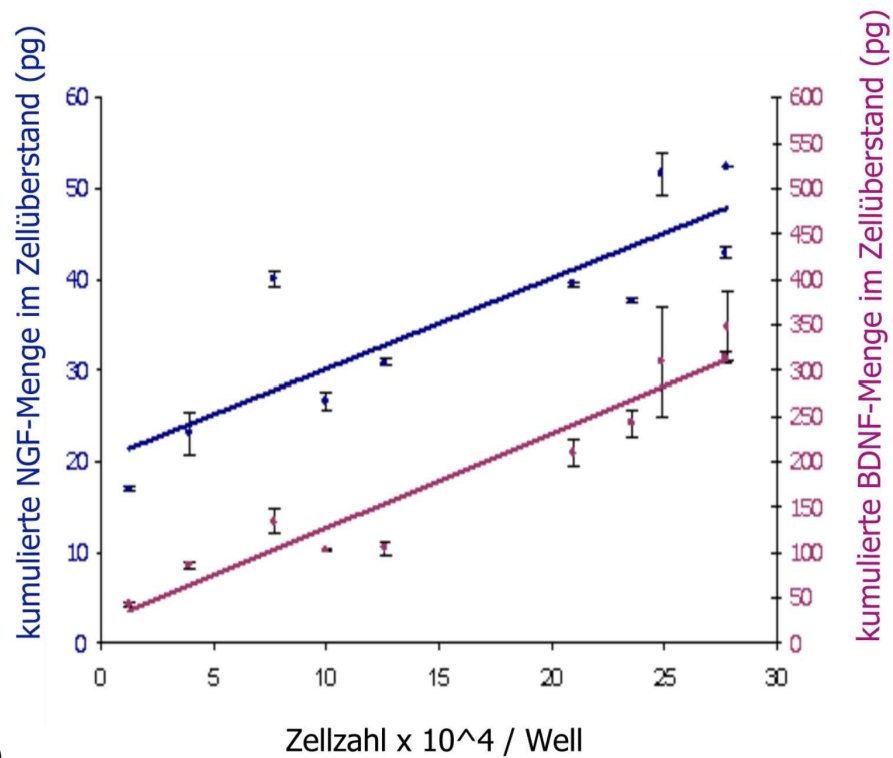
5. 4 Abhängigkeit des Sekretionsverhaltens für NGF und BDNF von der jeweiligen Wachstumsphase der Zellpopulation

Um einen möglichen Einfluss der aktuellen Wachstumsphase der Zellpopulation auf das Sekretionsverhalten von LA-4 Zellen für NGF und BDNF zu untersuchen, wurde die Menge der Neurotrophine in den Zellüberständen verschiedener Zellpopulationen, die sich in ihrer Konfluenzdichte voneinander unterschieden, bestimmt und zusätzlich zu der jeweiligen Zellzahl in Beziehung gesetzt.

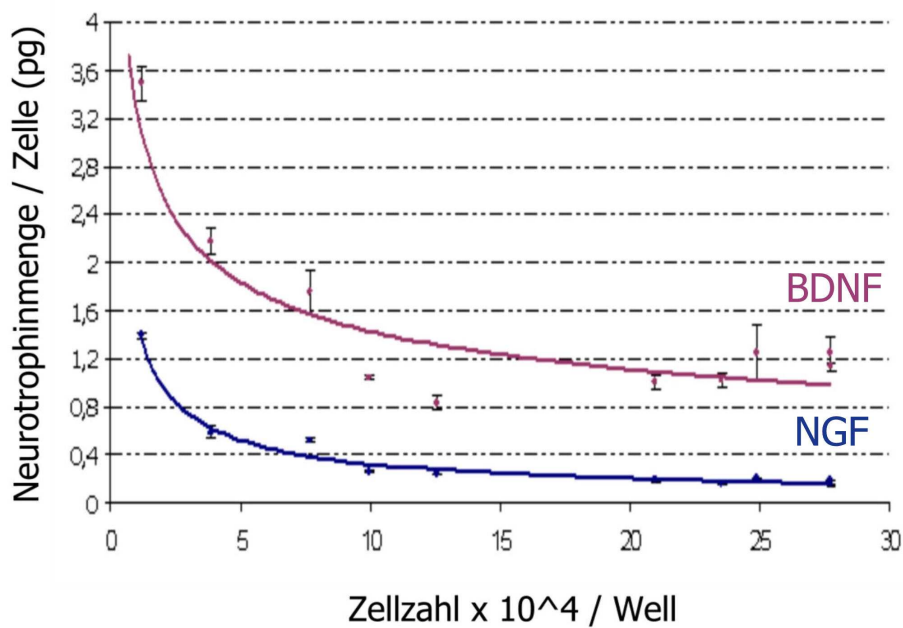
Zunächst wurden unterschiedliche Zellsuspensionen mit einer Konzentration von a) 1×10^4 b) 4×10^4 und c) 1×10^5 Zellen/ml hergestellt. Pro Versuchsansatz wurde eine 12-Well Zellkulturplatte benutzt, wobei jeweils 1ml in ein Well pipettiert wurde. Anschließend wurden jeweils täglich über einen Zeitraum von drei Tagen Zellkulturüberstände aus bestimmten Wells entnommen; die Zelldichte der in ihnen gewachsenen Zellpopulation wurde mittels Zellzählgerät ermittelt.

Die frisch entnommenen Zellkulturüberstände wurden kurz zentrifugiert bevor der zellfreien Überstände bei -20°C gelagert werden konnten.

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass mit steigender Konfluenzdichte der Population zwar die Gesamtmenge an NGF und BDNF im Zellüberstand kontinuierlich zunimmt [**Abb. 14a**], die auf die einzelne Zelle bezogene, sezernierte Menge der Neurotrophine jedoch deutlich abnimmt [**Abb. 14b**].



a)



b)

Abb. 14 a): kumulative Menge an sezerniertem NGF bzw. BDNF im Zellüberstand von LA-4 Zellpopulationen mit unterschiedlicher Konfluenzdichte

b): von der einzelnen Zelle der jeweiligen Population sezernierte Menge an NGF bzw. BDNF.

Während die Gesamtmenge der beiden NT im Zellüberstand mit steigender Konfluenzdichte zunimmt, sinkt die von der einzelnen Zelle sezernierte Menge an NGF bzw. BDNF stark ab. Dargestellt sind die Mittelwerte der Neurotrophinmengen \pm SD aus $n=3$ Experimenten mit 2-fachem Ansatz.

5. 5 Expression von Neurotrophin-Rezeptoren-mRNA in Abhängigkeit vom Konfluenzgrad der Zellpopulation

Die Expression der mRNA für die membranständigen Rezeptorproteine trkA, trkB, trkC sowie p75^{NTR} in LA-4 Zellen wurde mittels RT-PCR analysiert.

Zur Klärung der Frage nach einem möglichen Einfluss der aktuellen Wachstumsphase der jeweiligen Zellpopulation auf das Expressionsmuster, erfolgte die Analyse der Genexpression zum einen von Zellen aus prä-konfluenten Populationen, mit geringen Zell-zu-Zell Kontakten, zum anderen von Zellen aus Populationen mit hoher Konfluenzdichte.

Hierzu wurden zunächst 10^5 bzw. 10^6 Zellen in Wells einer 6-Well Zellkulturplatte ausgesät, die zuvor mit 3ml Medium gefüllt worden waren. Nach 48-stündiger Inkubationszeit erfolgte die Präparation der RNA.

Bei der in **Abbildung 15** dargestellten Auswertung zeigt sich, dass LA-4 Zellen sowohl den trkA als auch den gp145trkB und trkC Rezeptor exprimieren. Jedoch beschränkt sich die Expression lediglich auf Zellen, die aus prä-konfluenten Populationen stammen. Im Gegensatz hierzu werden die Rezeptorproteine für den gp95trkB Rezeptor in beiden Populationen exprimiert. Ein Nachweis für die Expression der mRNA des p75^{NTR} Rezeptors konnte weder in Zellen der Population mit hoher Konfluenzdichte noch in Zellen aus prä-konfluenten Population erbracht werden (nicht dargestellt).

Ergänzende Untersuchungen hinsichtlich der Expression von Neurotrophin-Genen konnten –unabhängig vom Konfluenzgrad der Zellpopulation— lediglich für NGF und BDNF eine Expression der jeweiligen mRNA nachweisen. Diese Beobachtung korreliert mit dem in Abschnitt 5.1 (S. 55) angeführten Nachweis einer Proteinexpression der beiden Neurotrophine in den Zellkulturüberständen.

Die fehlende Expression der mRNA für NT-3 und NT-4 (nicht dargestellt) korreliert ebenfalls mit dem fehlenden Nachweis ihrer Proteinexpression im Zellüberstand (S. 55).

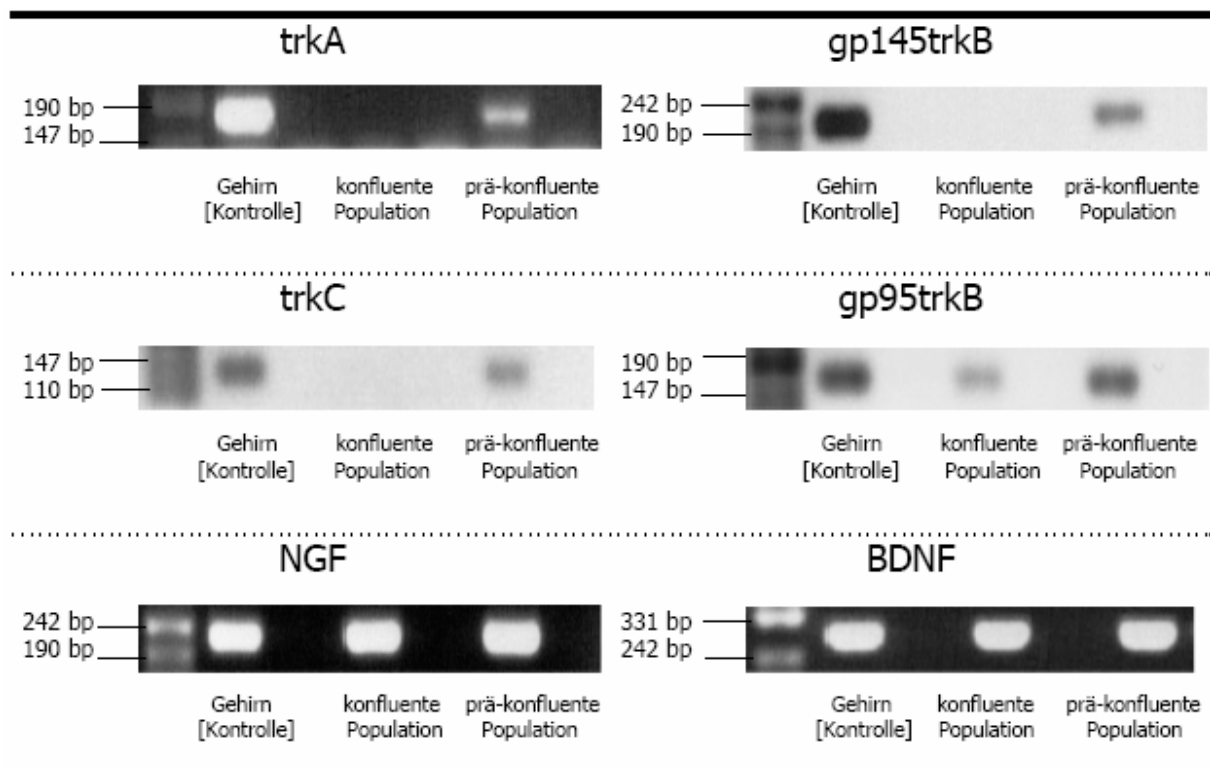


Abb. 15: RT-PCR Analyse der Expression von NT und NTR in LA-4 Zellen aus prä-konfluenten Populationen und konfluenten Populationen. Totale mRNA wurde aus Populationen mit 10^5 bzw. 10^6 LA-4 Zellen, die in 6-Well Platten kultiviert worden waren, und präpariertem Gehirngewebe der Maus, das als Kontrolle diente, extrahiert. Die RNA wurde anschließend in komplementäre DNA *revers* transkribiert und mittels spezifischer Primer für BDNF, NGF, NT-3 und NT-4 sowie trkA, trkB (gp145 und gp95), trkC und p75^{NTR} während einer 45-Zyklen umfassenden PCR amplifiziert. Die Elektrophorese der Produkte (BDNF 279 bp, NGF 217 bp, NT-3 216 bp, trkA 173 bp, gp145trkB 196 bp, gp95trkB 161 bp, trkC 133 bp, p75^{NTR} 174 bp) erfolgte auf einem 1 - 1,5%-igem Agarosegel mit anschließender Darstellung der Banden durch Ethidiumbromid. Während die Expression für BDNF und NGF in Zellen aus beiden Populationen (konfluent / prä-konfluent) nachweisbar war, fehlte diese für NT-3, unabhängig vom Konfluenzgrad der Population (nicht dargestellt). Die Expression der Neurotrophinrezeptoren trkA, trkC sowie des gp145trkB Rezeptors konnte lediglich in den Zellpopulationen mit fehlender Konfluenz nachgewiesen werden, wohingegen die Expression des gp95trkB Rezeptors in beiden Populationen nachweisbar war. Die Expression für p75^{NTR} war in keinem der beiden untersuchten Populationen nachweisbar (nicht dargestellt).

5. 6 Einfluss der Neurotrophine auf die Zellproliferation

Wie im vorangegangenen Versuch bereits nachgewiesen werden konnte, sind LA-4 Zellen in der Lage sowohl NGF und BDNF, als auch ihre Rezeptoren (trkA und trkB) zu exprimieren. Dieses Expressionsmuster unterliegt dem Einfluss der Wachstumsphase der jeweiligen Zellpopulation und weist zudem auf einen autokrinen Charakter der Neurotrophinsekretion hin. Letzteren galt es in der folgenden Versuchsreihe näher zu untersuchen. In Anbetracht der Tatsache, dass lediglich die sich im Wachstum befindlichen LA-4 Zellen die Neurotrophinrezeptoren trkA, gp145trkB und trkC exprimieren, darf man -in Analogie zu ihrer Funktion im neuronalen Gewebe- von einer Beteiligung der Neurotrophine an der Proliferation von Epithelzellen ausgehen.

Um diese Hypothese zu verifizieren, ist das Proliferationsgeschehen von LA-4 Zellpopulationen unter folgenden Bedingungen untersucht worden:

1. *Hemmung der Aktivität der trk-Rezeptoren;*
2. *Stimulation der trk-Rezeptoren mit exogenen Neurotrophinen im Überschuss.*

5. 6. 1 Proliferation unter Inhibition der trk-Rezeptoren durch K252a

Bei diesem Versuch wurden zunächst jeweils 100µL einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml in Kavitäten einer 96-Well Zellkulturplatte gefüllt und über einen Zeitraum von 24h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das alte Medium durch frisches Medium ersetzt, das 50 bzw. 200nM des trk-Rezeptor Inhibitors K252a (*Alomone Labs, Jerusalem, Israel*) enthielt. Nach einer weiteren

Inkubationsphase von 24h erfolgte mittels des CellTiter 96[®]AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assays die Bestimmung der Absorption der von metabolisch aktiven Zellen in Formazan umgesetzten Tetrazolium-Verbindung bei 490 nm.

Die somit ermittelten Absorptionswerte ermöglichten es, Rückschlüsse auf die Proliferation der LA-4 Zellen nach einer 24-stündigen Inkubationszeit mit K252a zu ziehen.

Abbildung 16 gibt die Ergebnisse nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen K252a Konzentrationen wieder. Anhand dieser Ergebnisse geht deutlich hervor, dass die Proliferation der LA-4 Zellen von der Aktivität von trk-Rezeptoren abhängig ist, zumal eine Inhibition der trk-Rezeptoren mit bereits 50nM K252a zu einer nahezu 50%igen Minderung des Absorptionswertes und somit der Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrollpopulation führte, die mit konventionellem Medium inkubiert worden war (Absorption nach Inkubation mit konventionellem Medium: $0,38 \pm 0,03$ SD; nach Inkubation mit Medium +50nM K252a: $0,2 \pm 0,02$ SD; nach Inkubation mit Medium +200nM K252a: $0,16 \pm 0,02$ SD).

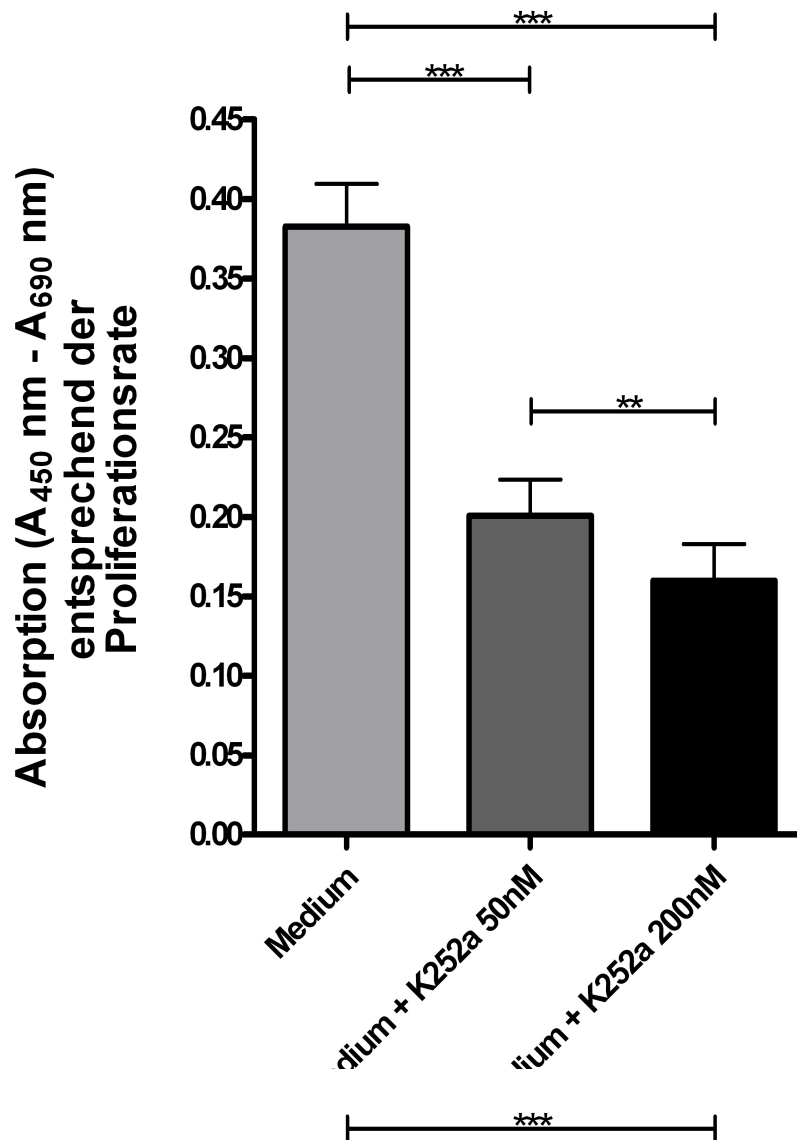


Abb. 16: Dosisabhängige Inhibition der Proliferation von LA-4 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 50 bzw. 200nM des Tyrosinkinase-Inhibitors K252a. Anhand der Absorption der von metabolisch aktiven Zellen in Formazan umgesetzten Tetrazolium-Verbindung konnte auf die Zahl lebender Zellen in Kultur rückgeschlossen werden. Als Kontrolle diente die Absorption der Menge an umgesetzter Tetrazolium-Verbindung aus Kulturen, die mit Medium ohne Zusatz von K252a inkubiert worden waren. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte +/- SD aus n=3 Experimenten mit 8-fachem Ansatz. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

5. 6. 2 Proliferation unter Stimulation mit Neurotrophinen

Wie in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, resultiert über eine Inaktivierung der trk-Rezeptoren durch den Inhibitor K252a eine antiproliferative Wirkung auf wachsende LA-4 Zellpopulationen. Vice versa dürften Neurotrophine als Liganden von trk-Rezeptoren die Proliferation von LA-4 Zellen begünstigen.

Im Zuge dieser Hypothese wurden in den folgenden Experimenten proliferierende LA-4 Zellen mit Medium inkubiert, das eines der drei Neurotrophine BDNF, NGF oder NT-3 in einer Konzentration von 1 ng/ml enthielt.

Zur Erfassung des Ausmaßes der Proliferation wurde neben dem bereits vorgestellten CellTiter 96[®]AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay in einem ergänzenden Versuchsaufbau ein BrdU Cell Proliferation ELISA als alternative Nachweismethode angewandt. Die Ermittlung der Proliferation nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubationszeit erfolgte dementsprechend anhand von Absorptionswerten der von metabolisch aktiven Zellen in Formazan umgesetzten Tetrazolium-Verbindung [**Abb. 17a**] bzw. des umgesetzten Peroxidase Substrates Tetramethyl-Benzidin [**Abb. 17b**] bei 490 nm.

5. 6. 2. 1 Proliferationsmessung unter Stimulation mit Neurotrophinen anhand des CellTiter 96[®]AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assays

Hierbei wurden die Kavitäten einer 96-Well Zellkulturplatte zunächst mit 100µL einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml gefüllt und im Brutschrank inkubiert. Um eine Interferenz der hinzugefügten Neurotrophine mit den bereits im Zellüberstand vorhandenen, von dem Epithel konsekutiv sezernierten Neurotrophinen zu vermeiden, wurde nach 24h das alte Medium gegen Medium, das kein FCS enthielt, ausgetauscht.

Wie in Voruntersuchungen nachgewiesen werden konnte, sezernieren LA-4 Zellen unter Inkubation mit Medium, das kein FCS beinhaltet nur sehr geringe Mengen an BDNF und NGF. Zudem dient das Entziehen von Serum der Synchronisation von Zelllinien in die G0-Phase des Zellzyklus. Für Fibroblasten beispielsweise konnte

aufgezeigt werden, dass Zellen auf Mitogene (z. B. Wachstumsfaktoren) angewiesen sind, um die G1-Phase zu durchschreiten und dass sobald sie die späte G1-Phase überschritten haben und in die S-Phase eingetreten sind, sie in der Lage sind, den Zellzyklus ohne Stimulation durch ein Mitogen zu durchlaufen [98]. Durch Entziehen von Serum und somit auch von Nährstoffen und mitogenen Stimuli verfallen Zellen, die sich in der G1-Phase befinden in die metabolisch minder aktive G0-Phase.

Nach Ablauf der 24-stündigen „Hunger“-Periode, erfolgte die Stimulation mit Medium, das eines der Neurotrophine (BDNF, NGF bzw. NT-3) in einer Konzentration von 1 ng/ml enthielt.

Im Anschluss an eine 48-stündige Inkubationszeit erfolgte die Proliferationsmessung mit Hilfe des CellTiter 96[®]AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assays. Als Kontrolle dienten die Werte aus Populationen, die entweder mit normalem Zellkulturmedium oder mit Medium, das 200nM des trk-Rezeptor Inhibitors K252a beinhaltete, inkubiert worden waren.

5. 6. 2. 2 Proliferationsmessung unter Stimulation mit Neurotrophinen anhand des BrdU Cell Proliferation ELISAs

Hierbei wurden die Kavitäten einer 96-Well Zellkulturplatte mit 100µL einer Zellsuspension mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml gefüllt und im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf von 24h erfolgte die Stimulation mit Medium, das NGF oder BDNF in einer Konzentration von 1 ng/ml enthielt bzw. zusätzlich zu einem der Neurotrophine 200nM des trk-Rezeptor Inhibitors K252a enthielt. Im Anschluß an eine 24-stündige Inkubationszeit erfolgte die Proliferationsmessung mittels des BrdU Cell Proliferation ELISAs.

Zusammenfassend konnte - im Gegensatz zum NT-3 - sowohl für NGF als auch für BDNF in beiden Versuchsreihen eine Potenzierung der Zellproliferation nachgewiesen werden [**Abb. 17a** und **b**]. Dieser Effekt war in Zellpopulationen, die mit BDNF stimuliert worden waren geringfügig stärker ausgeprägt als in Zellpopulationen, die mit NGF stimuliert worden waren und war durch Zugabe von K252a antagonisierbar [**Abb. 17b**].

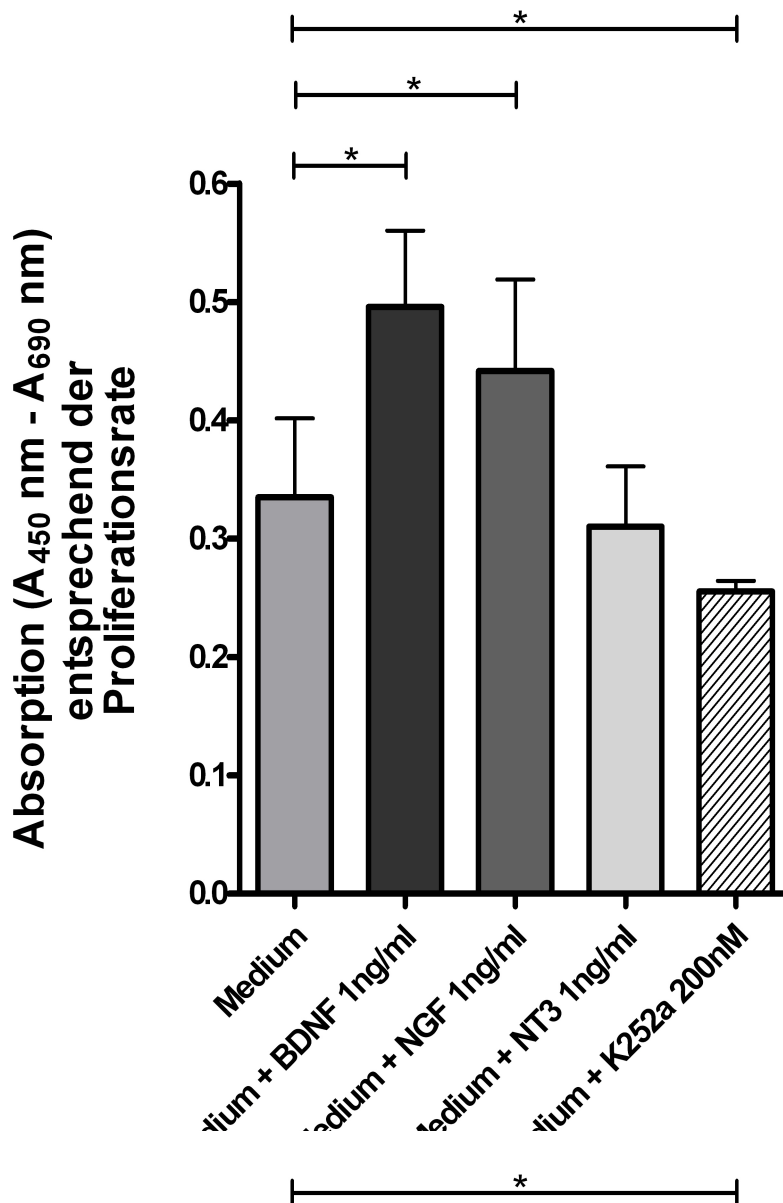


Abb. 17a: Proliferation von LA-4 Zellen unter Stimulation mit Neurotrophinen [*CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*]. Nach 24-stündiger Inkubation proliferierender Zellen mit Medium, dem kein FCS zugesetzt worden war, erfolgte eine Stimulation mit Medium, das eines der drei Neurotrophine BDNF, NGF oder NT-3 in einer Konzentration von 1ng/ml enthielt. Anhand der Absorption der von metabolisch aktiven Zellen in Formazan umgesetzten Tetrazolium-Verbindung bei 490 nm konnte auf die Zahl lebender Zellen in Kultur rückgeschlossen werden. Als +Kontrolle diente die Absorption der Menge an umgesetzter Tetrazolium-Verbindung aus Kulturen, die mit Medium ohne Zusatz von K252a inkubiert worden waren, als -Kontrolle die Absorption aus Kulturen, die mit Medium inkubiert worden waren, das K252a in einer Konzentration von 200nM enthielt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte nach 48h Inkubationszeit +/- SD aus n=3 Experimenten mit 6-fachem Ansatz.

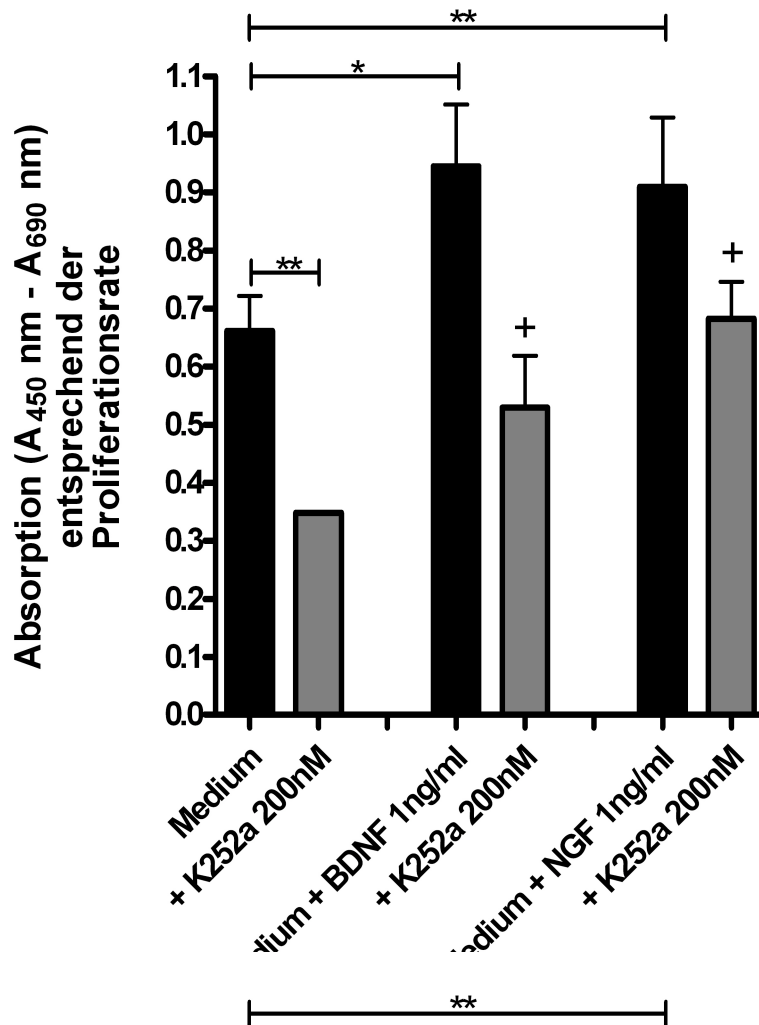


Abb. 17b: Proliferation von LA-4 Zellen unter Stimulation mit Neurotrophinen [*BrdU Cell Proliferation ELISA*]. Stimulation proliferierender Zellen mit Medium, das eines der Neurotrophine BDNF bzw. NGF in einer Konzentration von 1 ng/ml enthielt bzw. zusätzlich zu einem der Neurotrophine 200 nM des trk-Rezeptor Inhibitors K252a enthielt. Mittels Einbau des Pyrimidinanalogons BrdU anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen und Absorption des von mit anti-BrdU-Ak konjugierten Peroxidase umgesetzten Substrates Tetramethyl-Benzidin bei 490nm konnten Rückschlüsse auf die Anzahl proliferierender Zellen gezogen werden. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden +/- SD aus n=3 Experimenten mit 4-fachem Ansatz. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, +: signifikanter Unterschied zu den Werten mit Medium +BDNF bzw. +NGF ($p < 0,05$).

5. 6. 3 Proliferation von LA-4 Zellen in Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern gegen NGF bzw. BDNF

Um eine unterschiedliche Ausprägung der Beteiligung von NGF und BDNF am Proliferationsprozeß zu untersuchen, wurde in der folgenden Versuchsreihe die Wirkung beider von den Zellen konstitutiv sezernierten Neurotrophine mittels spezifischer Antikörper getrennt inhibiert und die Auswirkung des Vorganges auf das Proliferationsgeschehen untersucht.

Hierfür wurden die Kavitäten einer 96-Well Zellkulturplatte mit 100µL einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 5×10^3 Zellen/ml gefüllt und 48h im Brutschrank inkubiert. Nach Verstreichen der ersten Inkubationsphase erfolgte der erste Mediumwechsel, bei dem das alte Medium durch Medium, das eines der spezifischen Antikörper in einer Konzentration von 25 µg/ml enthielt, ersetzt wurde. (Als Kontrollmaß für eine allgemeine Hemmung der Wirkung von Neurotrophen wurde eine weitere Population mit dem trk-Antagonisten K252a inkubiert). Diesem folgte nach einer weiteren 48-stündigen Inkubationszeit ein weiterer Mediumwechsel, wobei auch dieses Mal dem Medium die jeweiligen Neurotrophinantikörper hinzugefügt worden waren.

Im Anschluss an eine abschließende Inkubationsphase von 24h erfolgte die Proliferationsmessung anhand des BrdU Cell Proliferation ELISAs, bei dem die Inkubationszeit mit BrdU dieses Mal –entgegen der Ausführungen im Abschnitt „Methoden“ (S.49)- zur Verstärkung der Absorption auf 24h verlängert wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation mit den Neurotrophinantikörpern zu einer signifikanten Suppression der Proliferation führte (+Anti-BDNF-AK: $0,71 \pm 0,08$ SD; +Anti-NGF-AK: $0,82 \pm 0,03$ SD; konventionelles Medium: $0,99 \pm 0,06$ SD). Die Suppression war besonders in den Populationen ausgeprägt, die mit Antikörpern gegen BDNF inkubiert worden waren [**Abb. 18**].

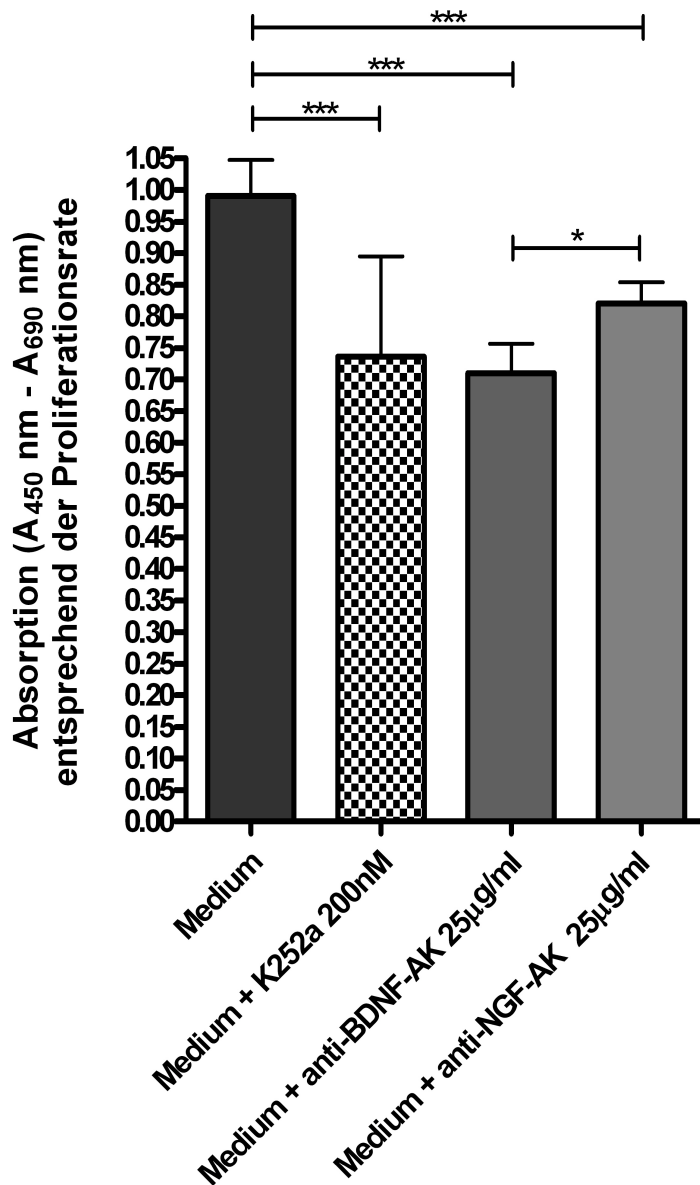


Abb. 18: Proliferation von LA-4 Zellen in Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern gegen NGF bzw. BDNF. Proliferierende LA-4 Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen mit Medium inkubiert, das Antikörper in einer Konzentration von 25µg/ml gegen eines der beiden Neurotrophine (NGF/BDNF) enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit BrdU, das von stoffwechselaktiven Zellen in die DNA eingebaut wird, wurde die Absorption des mittels Anti-BrdU-konjugierten Peroxidase umgesetzten Tetramethyl-Benzidins bei 490nm gemessen. Diese ist proportional zur Zahl lebendiger Zellen und diente somit als Maß für die Proliferationsmessung. Als Kontrollmaß für eine allgemeine Neutralisierung der Neurotrophinwirkung wurden zudem zusätzliche Zellpopulationen mit dem Neurotrophinrezeptorantagonisten K252a inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit den Neurotrophinantikörpern zu einer signifikanten Suppression der Proliferation führt. Der auf die Proliferation der LA-4 Zellen suppressive Effekt durch Neutralisierung von BDNF ist ausgeprägter als durch Neutralisierung von NGF. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der Absorption +/- SD aus n=3 Experimenten mit 4-fachem Ansatz. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

5. 7 Einfluss verschiedener Zytokine auf die Sekretion von NGF und BDNF

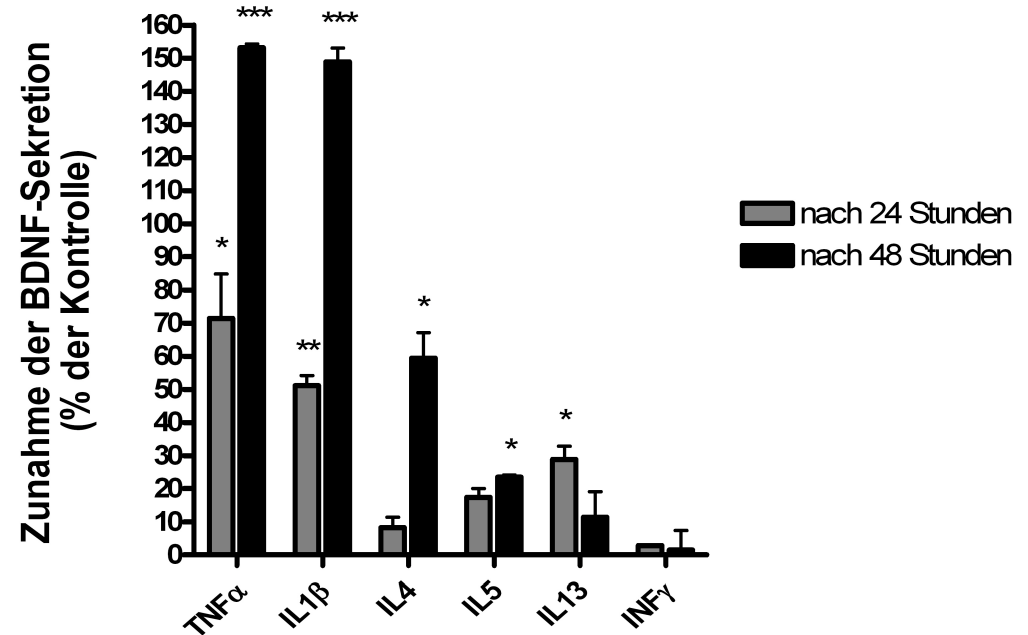
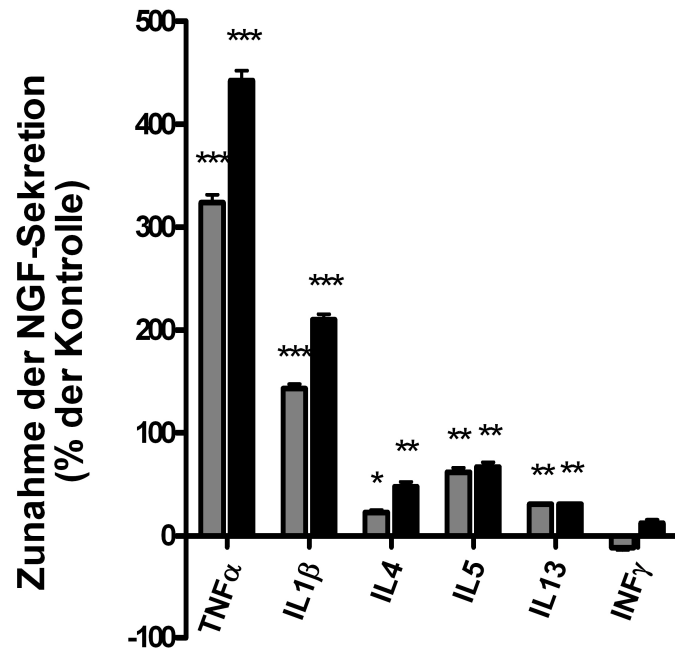
Pathologische Prozesse innerhalb der Lunge, wie sie z. B. im Rahmen des allergischen Asthmas stattfinden, sind mit einer gesteigerten Konzentration an lokalen und zirkulierenden Neurotrophinen verbunden [60, 140]. Die Identifikation der verschiedenen Zellarten, die an der verstärkten Neurotrophinproduktion beteiligt sind, ist bislang unvollständig. Jedoch ist bekannt, dass neben den Zellen des Immunsystems auch strukturelle Zellen des Lungengewebes in der Lage sind, ihre Produktion von Neurotrophinen in Anwesenheit von bestimmten Zytokinen zu steigern. Beispielsweise antworten Fibroblasten und glatte Muskelzellen auf eine Stimulation mit IL-1 β , indem sie vermehrt NGF sezernieren [57, 90].

In der folgenden Versuchsreihe galt es, den Einfluss verschiedener Zytokine, die maßgeblich an pathologischen Prozessen im Rahmen entzündlicher Atemwegserkrankungen beteiligt sind, auf die Sekretion von NGF und BDNF durch LA-4 Zellen zu untersuchen. Das Spektrum der untersuchten Zytokine umfasst neben den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF α und INF γ auch IL-4, IL-5, IL-13, die u. a. von T_H2-Lymphozyten produziert werden und das Entzündungsgeschehen beim allergischen Asthma maßgeblich vermitteln.

Zur Versuchsdurchführung wurden ca. 2×10^5 Zellen in Wells einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach zweitägiger Kultivierung erfolgte die Stimulation mit frischem Medium, das jeweils eines der Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-13 oder INF γ in einer Konzentration von 10 ng/ml enthielt. Im Anschluss an eine Inkubationsphase von 24-48h wurden Zellkulturüberstände zur Bestimmung der Konzentration von NGF und BDNF entnommen.

Anhand der Ergebnisse kann gezeigt werden, dass unter Stimulation mit den sog. T_H2-Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 die Sekretion von NGF [**Abb. 19a**] und BDNF [**Abb. 19b**] durch LA-4 Zellen geringfügig gesteigert ist.

Eine besonders ausgeprägte Steigerung der Sekretionsrate für beide Neurotrophine ist hingegen durch Stimulation mit IL-1 β und insbesondere TNF α zu verzeichnen; im Vergleich zur Kontrollpopulation, die lediglich mit normalem Medium inkubiert worden ist, ist die Sekretionsrate für BDNF in der Untersuchungspopulation nach 48h Inkubationszeit mit IL-1 β und TNF α um mehr als 100% gesteigert (IL-1 β : 148,91% \pm 4,3 SD; TNF α : 153,16% \pm 0,97 SD) [**Abb. 19b**]. Im Falle des NGF kommt es nach Stimulation mit IL-1 β zu einer Steigerung der Sekretionsrate um ca. 200% (210% \pm 5,64 SD), nach Stimulation mit TNF α um sogar mehr als 400% (442,3% \pm 10 SD) [**Abb. 19a**]. Eine Steigerung der Sekretionsrate nach Stimulation mit INF γ konnte weder für BDNF noch NGF nachgewiesen werden.



a)

b)

Abb. 19: Sekretion von NGF a) und BDNF b) unter Stimulation mit Zytokinen. LA-4 Zellpopulationen wurden 24-48h mit Medium inkubiert, das eines der Zytokine IL-1 β , TNF α , INF γ , IL-4, IL-5 oder IL-13 enthielt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der NT-Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA. Als Kontrolle dienten die NT-Konzentrationen aus Überständen von Zellpopulationen, die mit normalem Medium inkubiert worden waren. Während nach Stimulation mit den sog. T_H2-Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 lediglich eine geringfügige Sekretionssteigerung zu verzeichnen ist, ist diese besonders nach Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF α und IL-1 β ausgeprägt (für BDNF 48h nach Stimulation mit TNF α bzw. IL-1 β : Steigerung um ca. 150% der Kontrolle; für NGF 48h nach Stimulation mit TNF α : Steigerung um ca. 450% der Kontrolle und ca. 200% der Kontrolle nach Stimulation mit IL-1 β). Eine Änderung des Sekretionsverhaltens unter INF γ bleibt für beide NT aus. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der NT-Konzentrationen in den Zellüberständen nach einer Inkubationszeit von 24-48h +/- SD aus n=3 Experimenten mit 4-fachem Ansatz. Signifikante Unterschiede zur Konzentration in Überständen von Zellen, die mit normalem Medium inkubiert worden waren, sind folgend dargestellt *: p < 0,05; **: p < 0,01, ***: p < 0,001.

5. 8 Einfluss von Dexamethason auf die Sekretion von NGF und BDNF

Wie in der vorausgegangenen Versuchsreihe nachgewiesen werden konnte, erfolgt im Anschluss an eine Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen innerhalb des respiratorischen Epithels eine Hochregulation der Sekretion für NGF und BDNF.

Zur Untersuchung der Neurotrophinsekretion unter antiinflammatorischen Bedingungen, wurden zunächst ca. 2×10^5 Zellen in eine 24-Well Platte ausgesät. Nach 24h Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Medium, welches das Glucocorticoid Dexamethason in einer Menge von 0,1 bzw. 1 μM enthielt.

Im Anschluss an eine 24-stündige Inkubationsphase wurden Zellüberstände entnommen zwecks Bestimmung der NT-Konzentration.

Abbildung 20 zeigt, dass die Sekretion von sowohl NGF als auch von BDNF in LA-4 Zellen einer Inhibition durch Dexamethason unterliegt (Reduktion der NGF-Konzentration unter 0,1 μM Dexamethason um 79,65% der Konzentration der KG \pm 1,1 SD bzw. um 81,65% \pm 0,66 SD unter 1 μM Dexamethason; Reduktion der BDNF-Konzentration unter 0,1 μM Dexamethason um 69,21% der Konzentration der KG \pm 0,52 SD bzw. um 72,54% \pm 1,65 SD unter 1 μM Dexamethason).

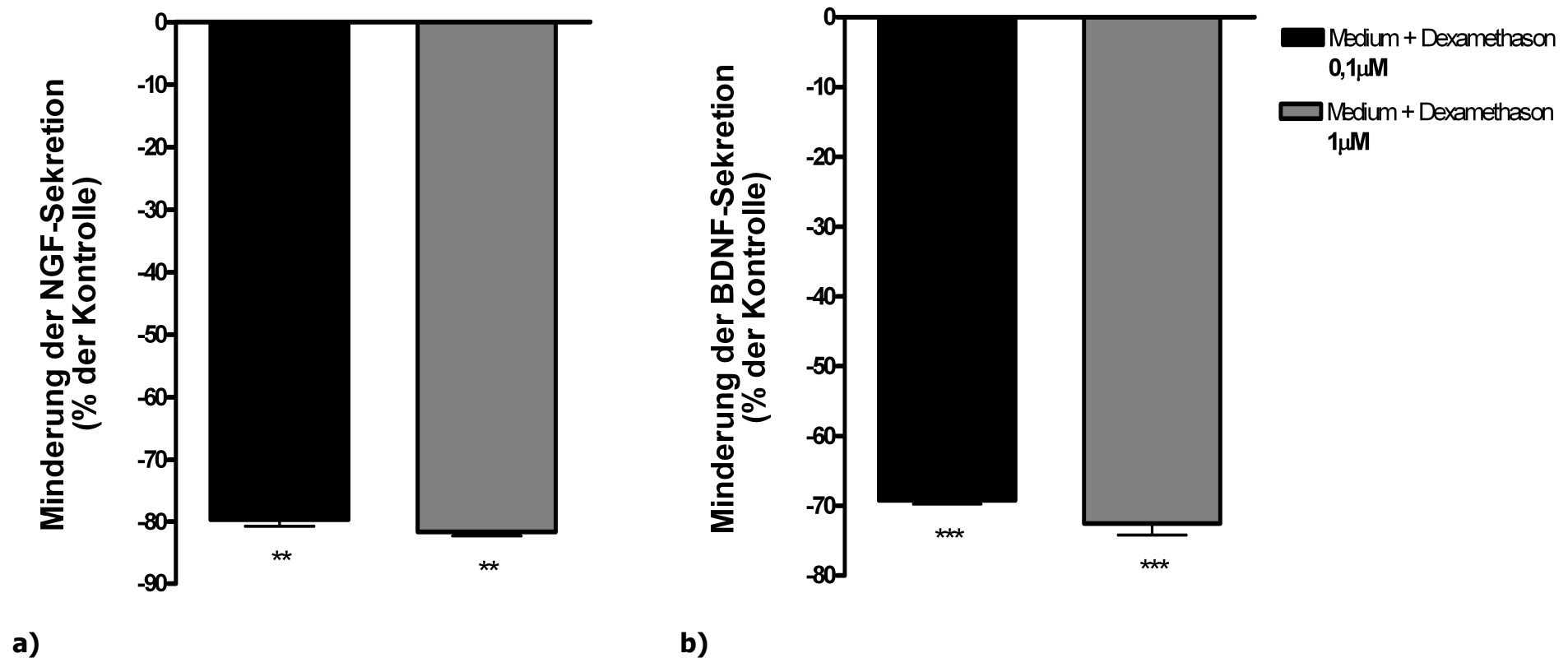


Abb. 20: Sekretion von NGF **a)** und BDNF **b)** in Anwesenheit von Dexamethason. LA-4 Zellen wurden mit Medium, das Dexamethason in einer Menge von 0,1 bzw. 1 μM enthielt, über einen Zeitraum von 24h inkubiert. Die Bestimmung der Konzentration der Neurotrophine im Zellüberstand erfolgte im Anschluss mittels ELISA. Als Kontrolle (KG) dienten die Neurotrophinkonzentrationen aus Überständen von Zellpopulationen, die mit normalem Medium inkubiert worden waren. Es zeigt sich in Anwesenheit von Dexamethason eine Inhibition der Sekretion beider Neurotrophine. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte der Neurotrophinkonzentration in den Zellüberständen nach einer Inkubationszeit von 24h +/- SD aus n=2 Experimenten mit 4-fachem Ansatz. Signifikante Unterschiede zur Konzentration in Überständen von der KG sind folgend dargestellt: **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

6 DISKUSSION

6. 1 Sekretion von NGF und BDNF unter basalen Bedingungen

Mit dieser Arbeit konnte anhand der LA-4 Zelllinie gezeigt werden, dass Zellen des Lungenepithels imstande sind, von den untersuchten, klassischen Neurotrophinen, sowohl NGF als auch BDNF unter basalen Bedingungen zu sezernieren. Der Nachweis erfolgte sowohl über eine quantitative Bestimmung der jeweiligen Neurotrophin-Proteine in Zellkulturüberständen mittels ELISA, als auch über eine Untersuchung der Expression der Neurotrophin-mRNA aus Zelllysaten von LA-4 Populationen mittels RT-PCR.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Nachweis der in-vitro Synthese von NGF durch weitere Zellen des Lungengewebes, wie beispielsweise glatte Muskelzellen [58, 90] und Fibroblasten [139, 160]. Der vorliegenden Arbeit vorangegangen ist bereits eine in-vitro Sekretion von NGF durch Epithelzellen des Atemtraktes beschrieben worden [56, 149]. Die NGF-Expression innerhalb des Atemwegsepithels konnte zudem anhand von immunhistochemischen Untersuchungen von Biopsien aus dem Atemtrakt von Asthmatikern nach niedrig dosierter Allergenprovokation bestätigt werden [88].

In Anbetracht der in der Literatur erwähnten Synthese von Neurotrophinen durch Epithelzellen unterschiedlichen Ursprunges, wie beispielsweise der Haut, der Cornea, des Amnions und des Intestinaltraktes [152, 156, 171, 191, 194], kann man zusammenfassend von einer allgemeinen Fähigkeit des Epithels zur Synthese von Neurotrophinen ausgehen.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten quantitativen Bestimmung der Neurotrophine zeigten die Ergebnisse durchgehend eine um ein Vielfaches erhöhte Sekretion des BDNF gegenüber dem NGF. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur Wachstumskinetik der LA-4 Zellpopulation fand sich ein Sekretionsmaximum für

beide Neurotrophine jeweils in der Phase des exponentiellen Wachstums. Letztere Beobachtung diente als Hinweis auf eine Beteiligung der beiden Neurotrophine am Proliferationsprozeß der Epithelzellen. Diese galt es im Rahmen nachfolgender Experimente näher zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Identifikation der Sekretionsrichtung für NGF und BDNF innerhalb des Epithels wiesen für beide Neurotrophine auf eine ähnliche Polarität hin, bei der ca. 70% der Gesamtmenge an Neurotrophinen in das basolaterale Kompartiment sezerniert wurden. Die Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Untersuchungen über den Sekretionsvektor für NGF in Epithelzelllinien des Intestinaltraktes, die zudem aufzeigen konnten, dass die primäre Sekretion über das basolaterale Kompartiment durch Stimulation mit IL-1 gesteigert werden kann [194]. Korrespondierend hierzu konnte in neuroendokrinen Zellen innerhalb des nasalen Epithels eine Zytokin-vermittelte Verstärkung der primären Sekretion für BDNF über das basolaterale Kompartiment aufgezeigt werden, die unter dem Glucocorticoid Budesonid minder ausgeprägt war [86].

Zusammenfassend bewirkt das Lungenepithel über die Polarität der Neurotrophin-Sekretion eine räumliche Kompartimentbildung, bei der NGF und BDNF hauptsächlich im Bereich des basalen Zellpols akkumulieren. Diese Eigenschaft des Epithels war insofern zu erwarten, als dass der basale Zellpol die direkte Kontaktstelle und Interaktionsfläche des Epithels mit den subepithelialen Mesenchymzellen, Immunzellen sowie zahlreichen Nervenfasern darstellt [2, 199].

6. 2 Sekretion von NGF und BDNF unter pro- und antiinflammatorischen Bedingungen

Mehrere Untersuchungen konnten mittlerweile zeigen, dass im Rahmen einer allergischen Entzündung erhöhte Konzentrationen an NGF und BDNF sowohl im Serum [¹⁶] als auch in der bronchoalveolären Flüssigkeit nachweisbar sind [¹⁹⁸].

Zudem ist bekannt, dass der Grad der Atemwegsentzündung und die klinische Symptomatik beim allergischen Asthma von der Ausprägung der gesteigerten Konzentration proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-1 β und TNF α , und der sog. T_H2-Zytokine bestimmt werden [^{4, 113, 208}].

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, konnte das Lungenepithel als eines der Hauptquellen für die Synthese der Neurotrophine NGF und BDNF innerhalb der Lunge identifiziert werden. Zudem war unter Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF α die konstitutive Sekretion von BDNF und in besonderem Maße des NGF deutlich gesteigert.

Eine Steigerung der Sekretionsrate für beide Neurotrophine mit vergleichsweise geringerer Ausprägung war auch unter Stimulation mit den T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 zu verzeichnen. Interessanterweise war unter der Stimulation der Epithelzellen mit dem T_H1-Zytokin IFN γ kein signifikanter Einfluss auf die Synthese von weder NGF, noch BDNF zu verzeichnen.

Diese Beobachtungen erweitern die Kenntnisse über den Einfluss proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise des IL-1 β und TNF α , auf die Synthese weiterer inflammatorischer Mediatoren und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise des Eotaxins oder des *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) durch das respiratorische Epithel [^{14, 73, 183}].

Die Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass das im Rahmen des allergischen Asthmas vorherrschende Milieu an Zytokinen ein wichtiger Trigger für das Lungenepithel zur Synthese von NGF und BDNF darstellt.

Glucocorticoide zählen zu den potentesten antiinflammatorischen und immunsuppressiven Agenzien, die imstande sind, die Synthese einer großen Bandbreite an für eine Immunreaktion grundlegenden Zytokinen und Oberflächenrezeptoren zu hemmen. Dieses erfolgt über eine Inhibition der Aktivierung von NFκB, einem Transkriptionsfaktor, der als Antwort auf proinflammatorische Stimuli zahlreiche immunregulatorische Gene aktiviert [129]. Ein Großteil der antiinflammatorischen Wirkung der Glucocorticoide beruht hierbei hauptsächlich in der Induktion des inhibitorischen Proteins κB α, das aktivierte NFκB-Dimere in inaktive zytoplasmatische Komplexe überführt.

Unter Berücksichtigung der antientzündlichen Wirkung der Glucocorticoide, die zur Therapie von Atemwegsinfekten erfolgreich angewandt werden, galt es in ergänzenden Untersuchungen herauszufinden, ob Dexamethason imstande ist, die Sekretion von NGF und BDNF durch das Lungenepithel zu inhibieren, wie es bereits für eine humane Astrozytomzelllinie nachgewiesen worden ist [51].

Die folgenden Ergebnisse zeigten unter Stimulation mit Dexamethason eine signifikante Reduktion der Sekretionsrate des Lungenepithels für beide Neurotrophine. Dieses ist vereinbar mit der bereits beschriebenen, hemmenden Wirkung der Glucocorticoide auf die Produktion unterschiedlicher proinflammatorischer Faktoren durch das Lungenepithel, wie beispielsweise des Eotaxins [61, 96] oder des Interleukin 6 und 8 [75, 172]. Ob die Reduktion der Sekretionsrate für Neurotrophine ähnlich dem der Zytokine über eine Hemmung von NFκB erfolgt, bleibt zu vermuten, zumal genomischen Untersuchungsergebnissen zufolge NFκB an der transkriptionellen Aktivierung des BDNF-Gens beteiligt sein soll [87, 114] und, zumindest unter inflammatorischen Bedingungen, die Genexpression für NGF regulieren soll [72].

Zusammenfassend besteht ein gewisser Anteil der antiinflammatorischen Wirkung der Glucocorticoide bei der Behandlung von Atemwegsentzündungen womöglich in der oben beschriebenen Unterdrückung der entzündungsbedingten epithelialen Überexpression von NGF und BDNF.

6. 3 Einfluss des NGF und BDNF auf das Proliferationsverhalten von Lungenepithelzellen

Im Rahmen der Schädigung von epithelialen Oberflächen und der anschließenden Entzündungsreaktion kommt es zwecks Proliferation und Re-Epithelialisierung der Wundfläche zur Hochregulation der Expression von diversen Wachstumsfaktoren. Innerhalb der Lunge sind neben den aktivierten Immunzellen und Fibroblasten u. a. auch Epithelzellen zur parakrinen und autokrinen Sekretion von Wachstumsfaktoren (z. B. EGF, TGF- β , KGF und HGF) imstande [34, 36].

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die beiden Neurotrophine NGF und BDNF als zusätzliche autokrine Wachstumsfaktoren für Lungenepithelzellen identifiziert werden, die hierbei ihre Wirkung über Tyrosin-Phosphorylierung der spezifischen trk-Rezeptoren, trkA und gp145trkB, entfalten.

Initiale Untersuchungen diesbezüglich zeigten zunächst auf, dass LA-4 Zellen in großen Mengen NGF und BDNF synthetisieren und in den Zellkulturüberstand sezernieren. Die Sekretion war besonders ausgeprägt in der Phase des exponentiellen Zellwachstums und deutete bereits auf eine Beteiligung beider Neurotrophine am Proliferationsgeschehen der Epithelzellen hin.

Einen weiteren Hinweis in dieser Richtung ergaben anschließende Untersuchungen der Genexpression der Neurotrophinrezeptoren. Letztere konnten aufzeigen, dass LA-4 Zellen die spezifischen trk-Rezeptoren der Tyrosinkinase-Rezeptorenfamilie trkA, trkB und trkC exprimieren. Interessanterweise beschränkte sich der Nachweis der Expression der Neurotrophinrezeptoren einzig auf proliferierende Zellpopulationen, die neben dem gp95trkB Rezeptor auch den an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligten gp145trkB Rezeptor exprimierten.

Während die Ergebnisse im Falle des NGF und BDNF mit einer autokrinen Sekretion zu vereinbaren waren, implizierte der Nachweis der trkC-Expression eine parakrine Funktion des NT-3 auf proliferierende Zellen.

Zum Nachweis der postulierten Beteiligung der sezernierten Neurotrophine an der Proliferation der Lungenepithelzellen, wurde die Proliferation von LA-4 Zellen zum einen unter hohen Konzentrationen an BDNF und NGF zum anderen unter selektiver Neutralisation des NGF oder BDNF durch spezifische Antikörper untersucht.

Im Hinblick auf den Nachweis der Expression von trkC durch proliferierende Zellen, wurden Zellpopulationen ergänzend mit NT-3 inkubiert, um einen parakrin-vermittelten Einfluss des Neurotrophins zu untersuchen.

Während eine pro-proliferative Wirkung von NT-3 auf die Epithelzellen ausblieb, war in den Populationen, die mit NGF oder BDNF stimuliert worden waren, gemäß den Erwartungen die Proliferationsrate um ca. 1/2-fach höher als die der Kontrollpopulation. Darüber hinaus führte sowohl die Neutralisation des NGF als auch in stärkerem Maße des BDNF durch spezifische Antikörper zu einer Hemmung der Proliferation der Epithelzellen.

Die Beobachtungen, dass von den Neurotrophinrezeptoren lediglich die Tyrosinkinase-Rezeptoren in proliferierenden Zellen exprimiert werden und dass NGF und BDNF in subkonfluenten Zellpopulationen die Proliferationsrate steigern, ließen auf eine über Tyrosinkinase-Rezeptoren vermittelte pro-proliferative Wirkung von NGF und BDNF auf die Epithelzellen schließen. Gestützt wird diese These durch die Ergebnisse aus Untersuchungen der Proliferation von LA-4 Zellen nach Inkubation mit K252a, einem spezifischen Hemmstoff der Neurotrophin-induzierten Tyrosin-Phosphorylierung von trk-Rezeptoren [10]. Diese zeigten nämlich eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation von LA-4 Zellen unter Inkubation mit K252a.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erweitert das Wissen über eine zusätzliche Funktion von Neurotrophinen als Wachstumsfaktoren für Zellen außerhalb des Nervensystems, wie beispielsweise des Immunsystems [68, 196], Endothelzellen [103], glatte Muskelzellen der Atemwege [59] und Epithelzellen der Haut [146]. Zudem gewinnen sie an weiterer Bedeutung, wenn man bedenkt, dass insbesondere pathologische Prozesse innerhalb der Lunge mit einer begleitenden Schädigung des Lungenepithels, wie sie z. B. im Rahmen des allergische Asthmas auftreten, mit einer gesteigerten Konzentration an lokalen und zirkulierenden Neurotrophinen einhergehen [60, 140, 151, 189].

Im Falle des allergischen Asthmas wird über eine wiederholte Gewebsschädigung durch Umweltstoffe mit begleitender pathologischer Immunantwort und einer erhöhten Anfälligkeit des Lungenepithels für oxidativen Stress ein chronisches Wundscenario unterhalten, dass längerfristig zu irreversiblen Umbauvorgängen innerhalb des Lungenparenchyms führt und die Entstehung einer Atemwegs-

hyperreaktivität begünstigt [36, 199]. Unter Berücksichtigung der anhand dieser Arbeit nachgewiesenen Funktion des NGF und BDNF als Wachstumsfaktoren für Lungenepithelzellen stellt die Überexpression der Neurotrophine im Rahmen des Asthmas somit u. a. einen Teil des autokrinen Reparaturmechanismus des beschädigten Lungenepithels dar.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Beim allergischen Asthma bronchiale handelt es sich um eine chronische Atemwegsentzündung, die mit einer variablen Atemwegsobstruktion nach Allergen-inhalation, einer Zunahme der Empfindlichkeit der Atemwege auf eine Vielzahl von Reizen (Atemwegshyperreaktivität) und strukturellen Umbauvorgängen innerhalb des Lungengewebes einhergeht.

Der Pathophysiologie liegt hierbei eine allgemeine neuro-immunmodulatorische Dysfunktion zugrunde, die u. a. über diverse Neuropeptide und eine Bandbreite an Zytokinen, unter denen die sog. T_H2-Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) sowie der TNF α und das IL-1 hervorzuheben wären, vermittelt wird.

Wachsenden Erkenntnissen nach, spielen auch Neurotrophine innerhalb der komplexen Wechselwirkungen zwischen dem Nerven- und Immunsystem eine besondere Rolle. Neben den aktivierten Immunzellen, die das Lungengewebe im Rahmen der Entzündung infiltrieren, konnten mittlerweile auch Strukturzellen der Lunge, wie beispielsweise Fibroblasten und glatte Muskelzellen, als Quelle für Neurotrophine identifiziert werden.

Inwiefern die Biologie des Lungenepithels einem Einfluss seitens der Neurotrophine unterliegt und ob das Epithel u. a. durch Expression von Neurotrophenen an der komplexen Dysregulation während des Entzündungsgeschehens beteiligt ist, war zum Zeitpunkt der Arbeit nicht hinreichend untersucht worden.

Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse kann aufgezeigt werden, dass das Lungenepithel imstande ist, die beiden Neurotrophine NGF und BDNF sowie ihre korrespondierenden Tyrosinkinase-Rezeptoren trkA und trkB zu exprimieren. Darüber hinaus kann dargelegt werden, dass die epitheliale Sekretionsrate unter Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β) und den sog. $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-13) nachweislich gesteigert ist.

Zusammenfassend implizieren die Beobachtungen eine aktive Teilnahme des Lungenepithels an der komplexen Dysregulation während des Entzündungsgeschehens über eine polarisierte, parakrine Sekretion von Neurotrophinen.

Die Proliferation von Epithelzellen stellt eine Grundvoraussetzung für die Integrität des Lungenepithels als physikalische Grenzschicht und dem Schutz vor dem Eindringen schädigender Substanzen dar. Beim allergischen Asthma kommt es bedingt durch die allgemein im Rahmen der pathologischen Immunantwort gesteigerte Synthese zytotoxischer Mediatoren innerhalb des Lungengewebes zu einer Zerstörung des Lungenepithels mit einem konsekutiven Verlust seiner Schutzfunktion. Neuen Erkenntnissen zufolge besteht ein Zusammenhang zwischen der Schädigung des Epithels und der pathologischen Atemwegshyperreaktivität.

Es herrscht bislang nur ein lückenhaftes Wissen über Faktoren, die an der Regulation der Proliferation von Lungenepithelzellen beteiligt sind. Dieses bezieht sich hauptsächlich auf Mitglieder der *fibroblast growth factor*-Familie (FGF-10, KGF, HGF) sowie der *epidermal growth factor* (EGF) Familie (EGF, TGF- α und - β).

Die vorliegende Arbeit präsentiert sowohl NGF als auch BDNF als weitere, wichtige autokrine Stimulatoren der Zellproliferation von Lungenepithelzellen, die ihre trophische Funktion, ähnlich dem KGF, über ihre Tyrosinkinase-Rezeptoren (trk) vermitteln. Die Beobachtung, dass das im Rahmen des Asthma bronchiale vorherrschende Milieu an Zytokinen ein wichtiger Trigger für das Lungenepithel zur Synthese von NGF und BDNF darstellt, unterstreicht die Bedeutung der autokrin vermittelten, trophischen Funktion beider Neurotrophine auf das Lungenepithel, die letztlich über eine Stimulation der Proliferation im Falle einer entzündlichen Gewebszerstörung zu einer Re-Epithelialisierung der Atemwege beitragen mag.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Untersuchungsergebnisse dienen zum besseren Verständnis des komplexen Systems an Interaktionen zwischen dem

Nerven- und Immunsystem sowie den Strukturzellen der Lunge, der dem allergischen Asthma bronchiale zugrunde liegt. Es wird hierbei deutlich, dass das Lungenepithel durch Sekretion von Neurotrophinen sowohl die epitheliale Homeostase kontrolliert als auch maßgeblich an den inflammatorischen Prozessen innerhalb der Atemwege beteiligt ist.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1] Abram M, Wegmann M, Fokuhl V, Sonar S, Luger EO, Kerzel S, Radbruch A, Renz H, Zemlin M. Nerve growth factor and neurotrophin-3 mediate survival of pulmonary plasma cells during the allergic airway inflammation. *J Immunol* 2009; 182: 4705-4712.
- 2] Adriaensen D, Brouns I, Van Genechten J, Timmermans JP. Functional morphology of pulmonary neuroepithelial bodies: extremely complex airway receptors. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 270: 25-40.
- 3] Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 2007; 85: 525–535.
- 4] Antoniu SA. Cytokine antagonists for the treatment of asthma: progress to date. *BioDrugs* 2009; 23: 241-251.
- 5] Arai A, Aoki M, Weihua Y, Jin A, Miura O. CrkL plays a role in SDF-1-induced activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway through Ras and Rac to mediate chemotactic signaling in hematopoietic cells. *Cell Signal* 2006; 18: 2162-2171.
- 6] Arévalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1523-1537.
- 7] Arshad SH, Kurukulaaratchy RJ, Fenn M, Matthews S. Early life risk factors for current wheeze, asthma, and bronchial hyperresponsiveness at 10 years of age. *Chest* 2005; 127: 502–508.
- 8] Baccari GC, Raucci F, Di Fiore MM, Monteforte R. Induced maturation of frog mast cells by nerve growth factor during ontogenesis. *Microsc Res Tech* 2003; 62: 439-450.
- 9] Barouch R, Kazimirsky G, Appel E, Brodie C. Nerve growth factor regulates TNF-alpha production in mouse macrophages via MAP kinase activation. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 1019-1026.
- 10] Berg MM, Sternberg DW, Parada LF, Chao MV. K252a inhibits nerve growth factor-induced TRK proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity. *J Biol Chem* 1992; 267: 13-16.

- 11] Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75^{NTR}. *EMBO* 1999; 18: 616-622.
- 12] Biffo S, Offenhaeuser N, Carter BD, Barde YA. Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 1995; 121: 2461-2470.
- 13] Bodart JF. Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues. *J Cell Biochem* 2010; 109: 850-857.
- 14] Boero S, Silvestri M, Ullmann N, Rossi GA. Modulation by flunisolide of tumor necrosis factor-alpha-induced stimulation of airway epithelial cell activities related to eosinophil inflammation. *J Asthma* 2010; 47: 381-387.
- 15] Bogiatzi SI, Fernandez I, Bichet JC, Marloie-Provost MA, Volpe E, Sastre X, Soumelis V. Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol* 2007; 178: 3373-3377.
- 16] Bonini S, Lambiase A, Lapucci G, Properzi F, Bresciani M, Bracci Laudiero ML, Mancini MJ, Procoli A, Micera A, Sacerdoti G, Bonini S, Levi-Schaffer F, Rasi G, Aloe L. Nerve growth factor and asthma. *Allergy* 2002; 57 Suppl 72: 13-15.
- 17] Bonini S, Rasi G, Bracci-Laudiero ML, Procoli A, Aloe L. Nerve growth factor: neurotrophin or cytokine? *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131: 80-84.
- 18] Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 1999; 286: 1358-1362.
- 19] Bourdin A, Neveu D, Vachier I, Paganin F, Godard P, Chanez P. Specificity of basement membrane thickening in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1367-1374.
- 20] Braun A, Lommatzsch M, Neuhaus-Steinmetz U, Quarcoo D, Glaab T, McGregor GP, Fischer A, Renz H. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to neuronal dysfunction in a model of allergic airway inflammation. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 431-440.

- 21] Braun A, Wiebe P, Pfeufer A, Gessner R, Renz H. Differential modulation of human immunoglobulin isotype production by the neuropeptides substance P, NKA and NKB. *J Neuroimmunol* 1999; 97: 43–50.
- 22] Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 2001; 21: 952-965.
- 23] Buckland ME, Cunningham AM. Alterations in expression of the neurotrophic factors glial cell line-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor, in the target-deprived olfactory neuroepithelium. *Neuroscience* 1999; 90: 333-347.
- 24] Bui NT, König HG, Culmsee C, Bauerbach E, Poppe M, Kriegstein J, Prehn JH. p75 neurotrophin receptor is required for constitutive and NGF-induced survival signalling in PC12 cells and rat hippocampal neurones. *J Neurochem* 2002; 81: 594-605.
- 25] Campenot RB, MacInnis BL. Retrograde transport of neurotrophins: fact and function. *J Neurobiol* 2004; 58: 217-229.
- 26] Canning BJ, Spina D. Sensory nerves and airway irritability. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 139-183.
- 27] Carim-Todd L, Bath KG, Fulgenzi G, Yanpallewar S, Jing D, Barrick CA, Becker J, Buckley H, Dorsey SG, Lee FS, Tessarollo L. Endogenous truncated TrkB.T1 receptor regulates neuronal complexity and TrkB kinase receptor function in vivo. *J Neurosci* 2009; 29: 678-685.
- 28] Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 2002; 33: 9-12.
- 29] Chiaramello A, Neuman K, Palm K, Metsis M, Neuman T. Helix-loop-helix transcription factors mediate activation and repression of the p75^{LNGFR} gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 6036-6044.
- 30] Choi DY, Toledo-Aral JJ, Segal R, Halegoua S. Sustained signaling by phospholipase C-gamma mediates nerve growth factor-triggered gene expression. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2695-2705.
- 31] Chong ZZ, Maiese K. The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol Histopathol* 2007; 22: 1251-1267.

- 32] Chuaychoo B, Hunter DD, Myers AC, Kollarik M, Undem BJ. Allergen-induced substance P synthesis in large-diameter sensory neurons innervating the lungs. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 325-331.
- 33] Chung KF. Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 619-625.
- 34] Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298: L715-731.
- 35] Culmsee C, Gerling N, Lehmann M, Nikolova-Karakashian M, Prehn JH, Mattson MP, Kriegstein J. Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor P75. *Neuroscience* 2002; 115: 1089-1108.
- 36] Davies DE. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 678-682.
- 37] Delcroix JD, Valletta J, Wu C, Howe CL, Lai CF, Cooper JD, Belichenko PV, Salehi A, Mobley WC. Trafficking the NGF signal: implications for normal and degenerating neurons. *Prog Brain Res* 2004; 146: 3-23.
- 38] De Santi L, Annunziata P, Sessa E, Bramanti P. Brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptor in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009; 287: 17-26.
- 39] Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, Le Bourhis X, Boilly B, Peyrat JP, Hondermarck H. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2001; 276: 17864-17870.
- 40] De Swert KO, Bracke KR, Demoor T, Brusselle GG, Joos GF. Role of the tachykinin NK1 receptor in a murine model of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation. *Respir Res* 2009; 10: 37.
- 41] De Swert KO, Joos GF. Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 171-181.
- 42] de Vries A, Engels F, Henricks PA, Leusink-Muis T, McGregor GP, Braun A, Groneberg DA, Dessing MC, Nijkamp FP, Fischer A. Airway hyper-responsiveness in allergic asthma in guinea-pigs is mediated by nerve growth factor via the induction of substance P: a potential role for trkA. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 1192-1200.

- 43] de Vries A, van Rijnsoever C, Engels F, Henricks PA, Nijkamp FP. The role of sensory nerve endings in nerve growth factor-induced airway hyperresponsiveness to histamine in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 771-776.
- 44] Dharmage SC, Erbas B, Jarvis D, Wjst M, Raheison C, Norbäck D, Heinrich J, Sunyer J, Svanes C. Do childhood respiratory infections continue to influence adult respiratory morbidity? *Eur Respir J* 2009; 33: 237–244.
- 45] Dinh QT, Groneberg DA, Peiser C, Springer J, Joachim RA, Arck PC, Klapp BF, Fischer A. Nerve growth factor-induced substance P in capsaicin-insensitive vagal neurons innervating the lower mouse airway. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1474-1479.
- 46] Dinh QT, Klapp BF, Fischer A. Airway sensory nerve and tachykinins in asthma and COPD. *Pneumologie* 2006; 60: 80-85.
- 47] Dinh QT, Mingomataj E, Quarcoo D, Groneberg DA, Witt C, Klapp BF, Braun A, Fischer A. Allergic airway inflammation induces tachykinin peptides expression in vagal sensory neurons innervating mouse airways. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 820-825.
- 48] Dobrowsky RT, Jenkins GM, Hannun YA. Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem* 1995; 270: 22135-22142.
- 49] Edling AE, Nanavati T, Johnson JM, Tuohy VK. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J Neurosci Res* 2004; 77: 709-717.
- 50] Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 1996; 16: 3123-31299.
- 51] Emmett C, Nc Neeley PA, Johnson RM. Evaluation of human astrocytoma and glioblastoma cell lines for nerve growth factor release. *Neurochem Int* 1997; 30: 465-474.

- 52] Erickson JT, Conover JC, Borday V, Champagnat J, Barbacid M, Yancopoulos G, Katz DM. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J Neurosci* 1996; 16: 5361–5371.
- 53] Ernsberger U. Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell Tissue Res* 2009; 336: 349-384.
- 54] Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* 2001; 276: 32687-32695.
- 55] Foster AP, Cunningham FM. Substance P induces activation, adherence and migration of equine eosinophils. *J Vet Pharmacol Ther* 2003; 26: 131-138.
- 56] Fox AJ, Barnes PJ, Belvisi MG. Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 2001; 424: 159-162.
- 57] Freund V, Frossard N. Expression of nerve growth factor in the airways and its possible role in asthma. *Prog Brain Res* 2004; 146: 335-346.
- 58] Freund V, Pons F, Joly V, Mathieu E, Martinet N, Frossard N. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J* 2002; 20: 458–463.
- 59] Freund-Michel V, Frossard N. Overexpression of functional TrkA receptors after internalisation in human airway smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 1964-1971.
- 60] Freund-Michel V, Frossard N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol Ther* 2008; 117: 52-76.
- 61] Fukakusa M, Bergeron C, Tulic MK, Fiset PO, Al Dewachi O, Laviolette M, Hamid Q, Chakir J. Oral corticosteroids decrease eosinophil and CC chemokine expression but increase neutrophil, IL-8, and IFN-gamma-inducible protein 10 expression in asthmatic airway mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 280-286.

- 62] Gallagher D, Gutierrez H, Gavalda N, O'Keeffe G, Hay R, Davies AM. Nuclear factor-kappaB activation via tyrosine phosphorylation of inhibitor kappaB-alpha is crucial for ciliary neurotrophic factor-promoted neurite growth from developing neurons. *J Neurosci* 2007; 27: 9664-9669.
- 63] Gao X, Daugherty RL, Tourtellotte WG. Regulation of low affinity neurotrophin receptor (p75(NTR)) by early growth response (Egr) transcriptional regulators. *Mol Cell Neurosci* 2007 Dec; 36: 501-514.
- 64] García-Suárez O, Pérez-Pinera P, Laurà R, Germana A, Esteban I, Cabo R, Silos-Santiago I, Cobo JL, Vega JA. TrkB is necessary for the normal development of the lung. *Respir Physiol Neurobiol* 2009; 167: 281-291.
- 65] Gibbs BF, Zillikens D, Grabbe J. Nerve growth factor influences IgE-mediated human basophil activation: functional properties and intracellular mechanisms compared with IL-3. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 735-747.
- 66] Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006; 7: 73.
- 67] Goyal M, Jaseja H, Verma N. Increased parasympathetic tone as the underlying cause of asthma: a hypothesis. *Med Hypotheses* 2010; 74: 661-664.
- 68] Hahn C, Islamian AP, Renz H, Nockher WA. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 787-794.
- 69] Hashimoto M, Sagara Y, Langford D, Everall IP, Mallory M, Everson A, Digicaylioglu M, Masliah E. Fibroblast growth factor 1 regulates signaling via the glycogen synthase kinase-3beta pathway. Implications for neuroprotection. *J Biol Chem* 2002; 277: 32985-32991.
- 70] Haxhiu MA, Kc P, Moore CT, Acquah SS, Wilson CG, Zaidi SI, Massari VJ, Ferguson DG. Brain stem excitatory and inhibitory signaling pathways regulating bronchoconstrictive responses. *J Appl Physiol* 2005; 98: 1961-1982.
- 71] He R, Geha RS. Thymic stromal lymphopoietin. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 13-24.
- 72] Heese K, Inoue N, Sawada T. NF-kB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 63-66.

- 73] Heiman AS, Abonyo BO, Darling-Reed SF, Alexander MS. Cytokine-stimulated human lung alveolar epithelial cells release eotaxin-2 (CCL24) and eotaxin-3 (CCL26). *Interferon Cytokine Res* 2005; 25: 82-91.
- 74] Hengerer B, Lindholm D, Heumann R, Rüther U, Wagner EF, Thoenen H. Lesion induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3899-3903.
- 75] Herbert C, Hettiaratchi A, Webb DC, Thomas PS, Foster PS, Kumar RK. Suppression of cytokine expression by roflumilast and dexamethasone in a model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 847-856.
- 76] Holgado-Madruga M, Wong AJ. Role of the Grb2-associated binder 1/SHP-2 interaction in cell growth and transformation. *Cancer Res* 2004; 64: 2007-2015.
- 77] Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1233-1244.
- 78] Holgate ST, Arshad HS, Roberts GC, Howarth PH, Thurner P, Davies DE. A new look at the pathogenesis of asthma. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 118: 439-450.
- 79] Hu C, Wedde-Beer K, Auais A, Rodriguez MM, Piedimonte G. Nerve growth factor and nerve growth factor receptors in respiratory syncytial virus-infected lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Pysiol* 2002; 283: 494-502.
- 80] Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 677-736.
- 81] Huang T, Stähler F. Effects of dietary Na⁺ deprivation on epithelial Na⁺ channel (ENaC), BDNF, and TrkB mRNA expression in the rat tongue. *BMC Neurosci* 2009; 10: 19.
- 82] Ibanez CF. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 1998; 21: 438-444.
- 83] Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, Qin FX, Yao Z, Cao W, Liu YJ. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper-type 2 cells response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005; 202: 1213–1223.

- 84] Ivanisevic L, Zheng W, Woo SB, Neet KE, Saragovi HU. TrkA receptor "hot spots" for binding of NT-3 as a heterologous ligand. *J Biol Chem* 2007; 282: 16754-16763.
- 85] Jeanneteau F, Chao MV. Promoting neurotrophic effects by GPCR ligands. *Novartis Found Symp* 2006; 276: 181-189.
- 86] Jornot L, Lacroix JS, Rochat T. Neuroendocrine cells of nasal mucosa are a cellular source of brain-derived neurotrophic factor. *Eur Respir J* 2008; 32: 769-774.
- 87] Kairisalo M, Korhonen L, Sepp M, Pruunsild P, Kukkonen JP, Kivinen J, Timmusk T, Blomgren K, Lindholm D. NF-kappaB-dependent regulation of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons by x-linked inhibitor of apoptosis protein. *Eur J Neurosci* 2009; 30: 958-966.
- 88] Kassel O, de Blay F, Duvernelle C, Olgart C, Israel-Biet D, Krieger P, Moreau L, Pauli G, Frossard N. Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1432-1440.
- 89] Katsanos GS, Anogeianaki A, Orso C, Tete S, Salini V, Antinolfi PL, Sabatino G. Impact of substance P on cellular immunity. *J Biol Regul Homeost Agents* 2008; 22: 93-98.
- 90] Kemi C, Grunewald J, Eklund A, Höglund CO. Differential regulation of neurotrophin expression in human bronchial smooth muscle cells. *Respir Res* 2006; 7: 18.
- 91] Kerzel S, Päth G, Nockher WA, Quarcoo D, Raap U, Groneberg DA, Dinh QT, Fischer A, Braun A, Renz H. Pan-neurotrophin receptor p75 contributes to neuronal hyperreactivity and airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol* 2003; 28: 170-178.
- 92] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121: 823-835.
- 93] Kimmelman AC, Osada M, Chan AM. R-Ras3, a brain-specific Ras-related protein, activates Akt and promotes cell survival in PC12 cells. *Oncogene* 2000; 19: 2014-2022.

- 94] Klein M, Hempstead BL, Teng KK. Activation of STAT5-dependent transcription by the neurotrophin receptor Trk. *J Neurobiol* 2005; 63: 159-171.
- 95] Klein R, Conway D, Parada LF, Barbacid M. The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 1990; 61: 647-656.
- 96] Komiya A, Nagase H, Yamada H, Sekiya T, Yamaguchi M, Sano Y, Hanai N, Furuya A, Ohta K, Matsushima K, Yoshie O, Yamamoto K, Hirai K. Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cell Immunol* 2003; 225: 91-100.
- 97] Krause DS. Bone marrow-derived lung epithelial cells. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 699-702.
- 98] Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J, Niemann H. Cell Cycle Synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 412-419.
- 99] Kummer W, Lips KS, Pfeil U. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 219-234.
- 100] Lalive PH, Kantengwa S, Benkhoucha M, Juillard C, Chofflon M. Interferon-beta induces brain-derived neurotrophic factor in peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2008; 197: 147-151.
- 101] Larsen GL, Fratelli C, Loader J, Kang JK, Dakhama A. Neuropeptide release from airways of young and fully-grown rabbits. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 1242-1249.
- 102] Lebrun-Julien F, Morquette B, Douillette A, Saragovi HU, Di Polo A. Inhibition of p75(NTR) in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 2009; 40: 410-420.
- 103] Lecht S, Arien-Zakay H, Marcinkiewicz C, Lelkes PI, Lazarovici P. Nerve growth factor-induced protection of brain capillary endothelial cells exposed to oxygen-glucose deprivation involves attenuation of Erk phosphorylation. *J Mol Neurosci* 2010; 41: 183-192.

- 104] Lee FS, Kim AH, Khursigara G, Chao MV. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 281-286.
- 105] Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001; 294: 1945-1948.
- 106] Lee TS, Liu YJ, Tang GJ, Yien HW, Wu YL, Kou YR. Wood smoke extract promotes both apoptosis and proliferation in rat alveolar epithelial type II cells: the role of oxidative stress and heme oxygenase-1. *Crit Care Med* 2008; 36: 2597-2606.
- 107] Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J* 1987; 6: 1145-1154.
- 108] Levite M. Neurotransmitters activate T-cells and elicit crucial functions via neurotransmitter receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 460-471.
- 109] Liu YJ. TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. *Adv Immunol* 2009; 101: 1-25.
- 110] Lommatzsch M, Quarcoo D, Schulte-Herbrüggen O, Weber H, Virchow JC, Renz H, Braun A. Neurotrophins in murine viscera: a dynamic pattern from birth to adulthood. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23: 495-500.
- 111] Luberg K, Wong J, Weickert CS, Timmusk T. Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem* 2010; 113: 952-964.
- 112] Luikart BW, Nef S, Shipman T, Parada LF. In vivo role of truncated trkb receptors during sensory ganglion neurogenesis. *Neuroscience* 2003; 117: 847-858.
- 113] Manise M, Schleich F, Gusbin N, Godinas L, Henket M, Antoine N, Corhay JL, Louis R. Cytokine production from sputum cells and blood leukocytes in asthmatics according to disease severity. *Allergy* 2010; 65: 889-896.
- 114] Marini AM, Jiang X, Wu X, Tian F, Zhu D, Okagaki P, Lipsky RH. Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restor Neurol Neurosci* 2004; 22: 121-130.

- 115] Marinova T, Philipov S, Aloe L. Nerve growth factor immunoreactivity of mast cells in acute involuted human thymus. *Inflammation* 2007; 30: 38-43.
- 116] McAlexander MA, Carr MJ. Peripheral mechanisms I: plasticity of peripheral pathways. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 129-154.
- 117] McCary C, Tancowny BP, Catalli A, Grammer LC, Harris KE, Schleimer RP, Kulka M. Substance P downregulates expression of the high affinity IgE receptor (FcεRI) by human mast cells. *J Neuroimmunol* 2010; 220: 17-24.
- 118] McCubrey JA, Milella M, Tafuri A, Martelli AM, Lunghi P, Bonati A, Cervello M, Lee JT, Steelman LS. Targeting the Raf/MEK/ERK pathway with small-molecule inhibitors. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9: 614-630.
- 119] Metsis M. Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation. *Cell Mol Sci* 2001; 58: 1014-1020.
- 120] Metsis M, Timmusk T, Arenas E, Persson H. Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8802-8806.
- 121] Micera A, Lambiase A, Stampachiacchiere B, Bonini S, Bonini S, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 245-256.
- 122] Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, Maquart FX, Aloe L, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6162–6167.
- 123] Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T. TrkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a fulllength and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 143-153.
- 124] Mizoguchi Y, Monji A, Kato T, Seki Y, Gotoh L, Horikawa H, Suzuki SO, Iwaki T, Yonaha M, Hashioka S, Kanba S. Brain-derived neurotrophic factor induces sustained elevation of intracellular Ca²⁺ in rodent microglia. *J Immunol* 2009; 183: 7778-7786.

- 125] Mizoguchi Y, Monji A, Nabekura J. Brain-derived neurotrophic factor induces long-lasting Ca^{2+} -activated K^{+} currents in rat visual cortex neurons. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 1417-1424.
- 126] Mostafa GA, Reda SM, Abd El-Aziz MM, Ahmed SA. Sputum neurokinin A in Egyptian asthmatic children and adolescents: relation to exacerbation severity. *Allergy* 2008; 63: 1244-1247.
- 127] Mukaiyama O, Morimoto K, Nosaka E, Takahashi S, Yamashita M. Greater involvement of neurokinins found in Guinea pig models of severe asthma compared with mild asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134: 263-272.
- 128] Nassenstein C, Braun A, Erpenbeck VJ, Lommatzsch M, Schmidt S, Krug N, Luttmann W, Renz H, Virchow JC Jr. The neurotrophins nerve growth factor, brain derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma. *J Exp Med* 2003; 198: 455-467.
- 129] Newton R, Holden NS, Catley MC, Oyelusi W, Leigh R, Proud D, Barnes PJ. Repression of inflammatory gene expression in human pulmonary epithelial cells by small-molecule IkappaB kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321: 734-742.
- 130] Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón LC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 161-166.
- 131] Nikam SS, Tennekoon GI, Christy BA, Yoshino JE, Rutkowski JL. The zinc finger transcription factor Zif268/Egr-1 is essential for schwann cell expression of the p75 NGF receptor. *Mol Cell Neurosci* 1995; 6: 337-348.
- 132] Ninkina N, Adu J, Fischer A, Pinon L GP, Buchman VL, Davies AM. Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons. *Embo J* 1996; 15: 6385-6393.
- 133] Nockher WA, Renz H. Neurotrophins and asthma: novel insight into neuroimmune interaction. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 67-71.
- 134] Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 583-589.

- 135] Noga O, Englmann C, Hanf G, Grützkau A, Guhl S, Kunkel G. Activation of the specific neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC influences the function of eosinophils. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1348–1354.
- 136] Noga O, Hanf G, Schäper C, O'Connor A, Kunkel G. The influence of inhalative corticosteroids on circulating nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1906–1912.
- 137] Nosrat I, Seiger A, Olson L, Nosrat CA. Expression patterns of neurotrophic factor mRNAs in developing human teeth. *Cell Tissue Res* 2002; 310: 177-187.
- 138] Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 2004; 427: 843– 848.
- 139] Olgart C, Frossard N. Human lung fibroblasts secrete nerve growth factor: effect of inflammatory cytokines and glucocorticoids. *Eur Respir J* 2001; 18: 115–121.
- 140] Olgart Höglund C, de Blay F, Oster JP, Duvernelle C, Kassel O, Pauli G, Frossard N. Nerve growth factor levels and localisation in human asthmatic bronchi. *Eur Respir J* 2002; 20: 1110-1116.
- 141] Ozaki T, Mui K, Yamagami S. Comparison of the effects of dopamine D1 and D2 receptor antagonists on nerve growth factor mRNA expression. *Eur J Pharmacol* 1999; 369: 133-143.
- 142] Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 272-280.
- 143] Pattarawarapan M, Burgess K. Molecular basis of neurotrophin-receptor interactions. *J Med Chem* 2003; 46: 5277-5291.
- 144] Perez P, Coll PM, Hempstead BL, Martin-Zanaca D, Chao MV. NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci* 1995; 6: 97-105.

- 145] Perrone L, Paladino S, Mazzone M, Nitsch L, Gulisano M, Zurzolo C. Functional interaction between p75NTR and TrkA: the endocytic trafficking of p75NTR is driven by TrkA and regulates TrkA-mediated signalling. *Biochem J* 2005; 385: 233-241.
- 146] Pincelli C, Marconi A. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2000; 22: 71-79.
- 147] Pisi G, Olivieri D, Chetta A. The airway neurogenic inflammation: clinical and pharmacological implications. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8: 176-181.
- 148] Plo I, Bono F, Bezombes C, Alam A, Bruno A, Laurent G. Nerve growth factor-induced protein kinase C stimulation contributes to TrkA-dependent inhibition of p75 neurotrophin receptor sphingolipid signaling. *J Neurosci Res* 2004; 77: 465-474.
- 149] Pons F, Freund V, Kuissu H, Mathieu E, Olgart C, Frossard N. Nerve growth factor secretion by human lung epithelia A549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions. *Eur J Pharmacol* 2001; 428: 365-369.
- 150] Poulsen FR, Lauterborn J, Zimmer J, Gall CM. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor transcripts after pilocarpine-induced seizure-like activity is related to mode of Ca²⁺ entry. *Neuroscience* 2004; 126: 665-676.
- 151] Prakash Y, Thompson MA, Meuchel L, Pabelick CM, Mantilla CB, Zaidi S, Martin RJ. Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Rev Respir Med* 2010; 4: 395-411.
- 152] Qi H, Chuang EY, Yoon KC, de Paiva CS, Shine HD, Jones DB, Pflugfelder SC, Li DQ. Patterned expression of neurotrophic factors and receptors in human limbal and corneal regions. *Mol Vis* 2007; 13: 1934-1941.
- 153] Raap U, Braunstahl GJ. The role of neurotrophins in the pathophysiology of allergic rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010; 10: 8-13.
- 154] Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS, Chao MV. Transactivation of TRK neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci* 2004; 24: 6650-6658.

- 155] Ratti H, Zhang M, Kunkel G. Correlation between neutral endopeptidase (NEP) 3.4.24.11 in serum and the degree of the bronchial hyperreactivity. *Regul Pept* 2001; 97: 181-186.
- 156] Raychaudhuri SP, Jiang WY, Raychaudhuri SK. Revisiting the Koebner phenomenon: role of NGF and its receptor system in the pathogenesis of psoriasis. *Am J Pathol* 2008; 172: 961-971.
- 157] Razani-Boroujerdi S, Behl M, Hahn FF, Pena-Philippides JC, Hutt J, Sopori ML. Role of muscarinic receptors in the regulation of immune and inflammatory responses. *J Neuroimmunol* 2008; 194: 83-88.
- 158] Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1545-1564.
- 159] Renz H. The role of neurotrophins in bronchial asthma. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 231-237.
- 160] Ricci A, Graziano P, Bronzetti E, Saltini C, Sciacchitano S, Cherubini E, Renzoni E, Du Bois RM, Grutters JC, Mariotta S. Increased pulmonary neurotrophin protein expression in idiopathic interstitial pneumonias. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2007; 24: 13-23.
- 161] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003; 302: 1704-1709.
- 162] Rubio N. Mouse astrocytes store and deliver brain-derived neurotrophic factor using the non-catalytic gp95trkB receptor. *Europ J of Neurosci* 1997; 9: 1847-1853.
- 163] Sacristan MP, Diego JG de, Bonilla M, Martin-Zanca D. Molecular cloning and characterization of the 5' region of the mouse trkA proto-oncogene. *Oncogene* 1999; 18: 5836-5842.
- 164] Samah B, Porcheray F, Gras G. Neurotrophins modulate monocyte chemotaxis without affecting macrophage function. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 476-486.
- 165] Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1279-1284.

- 166] Sebastian K, Borowski A, Kuepper M, Friedrich K. Signal transduction around thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in atopic asthma. *Cell Commun Signal* 2008; 6: 5.
- 167] See H, Wark P. Innate immune response to viral infection of the lungs. *Paediatr Respir Rev* 2008; 9: 243-250.
- 168] Shah AG, Friedman MJ, Huang S, Roberts M, Li XJ, Li S. Transcriptional dysregulation of TrkA associates with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 17. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 4141-4152.
- 169] Skaper SD. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008; 7: 46-62.
- 170] Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 1994; 77: 627-638.
- 171] Stanzel RD, Lourenssen S, Blennerhassett MG. Inflammation causes expression of NGF in epithelial cells of the rat colon. *Exp Neurol* 2008; 211: 203-213.
- 172] Stellato C. Glucocorticoid actions on airway epithelial responses in immunity: functional outcomes and molecular targets. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1247-1263.
- 173] Stempelj M, Ferjan I. Signaling pathway in nerve growth factor induced histamine release from rat mast cells. *Inflamm Res* 2005; 54: 344-349.
- 174] Strell C, Sievers A, Bastian P, Lang K, Niggemann B, Zänker KS, Entschladen F. Divergent effects of norepinephrine, dopamine and substance P on the activation, differentiation and effector functions of human cytotoxic T lymphocytes. *BMC Immunol*; 10: 62.
- 175] Strieter RM. What differentiates normal lung repair and fibrosis? Inflammation, resolution of repair, and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 305-310.
- 176] Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, Kummer W, Wess J, Haberberger RV. Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 1444-1451.

- 177] Sun J, Ramnath RD, Bhatia M. Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C696-704.
- 178] Sun P, Watanabe H, Takano K, Yokoyama T, Fujisawa J, Endo T. Sustained activation of M-Ras induced by nerve growth factor is essential for neuronal differentiation of PC12 cells. *Genes Cells* 2006; 11: 1097-1113.
- 179] Suzuki Y, Mizoguchi I, Uchida N. Detection of neurotrophic factors in taste buds by laser capture microdissection, immunohistochemistry, and in situ hybridization. *Arch Histol Cytol* 2007; 70: 117-126.
- 180] Swindle EJ, Collins JE, Davies DE. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 23-34.
- 181] Takemura M, Quarcoo D, Niimi A, Dinh QT, Geppetti P, Fischer A, Chung KF, Groneberg DA. Is TRPV1 a useful target in respiratory diseases? *Pulm Pharmacol Ther* 2008; 21: 833-839.
- 182] Takeuchi Y, Yamamoto H, Miyakawa T, Miyamoto E. Increase of brain-derived neurotrophic factor gene expression in NG108-15 cells by the nuclear isoforms of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem* 2000; 74: 1913-1922.
- 183] Takizawa H. Bronchial epithelial cells in allergic reactions. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 305-311.
- 184] Tan Y, Yang T, Liu S, Liu H, Xiang Y, Qu F, Li H, Qin X. Infection with respiratory syncytial virus alters peptidergic innervation in the lower airways of guinea-pigs. *Exp Physiol* 2008; 93: 1284-1291.
- 185] Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 2005; 25: 5455-5463.
- 186] Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol* 2010; 70: 350-359.
- 187] Teng KK, Hempstead BL. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 35-48.

- 188] Timmusk T, Belluardo N, Persson H, Metsis M. Developmental regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNAs transcribed from different promoters in the rat brain. *Neuroscience* 1994; 60: 287-291.
- 189] Tortorolo L, Langer A, Polidori G, Vento G, Stampachiacchere B, Aloe L, Piedimonte G. Neurotrophin overexpression in lower airways of infants with respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 233-237.
- 190] Tuluc F, Lai JP, Kilpatrick LE, Evans DL, Douglas SD. Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. *Trends Immunol* 2009; 30: 271-276.
- 191] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, Hurukawa S, Araie M, Sakuragawa N. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. *Neurosci Res* 2000; 62: 585-590.
- 192] Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Hongo JA, Zhao W, Presta LG. High-resolution mapping of the binding site of trkA for nerve growth factor and trkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the trk receptors. *J Biol Chem* 1998; 273: 5829-5840.
- 193] Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Shelton DL, Parada LF, Presta LG. An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J* 1995; 14: 2795-2805.
- 194] Varilek GW, Neil GA, Bishop WP, Lin J, Pantazis NJ. Nerve growth factor synthesis by intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1995; 269: 445-452.
- 195] Vega JA, García-Suárez O, Germanà A. Vertebrate thymus and the neurotrophin system. *Int Rev Cytol* 2004; 237: 155-204.
- 196] Vega JA, García-Suárez O, Hannestad J, Pérez-Pérez M, Germanà A. Neurotrophins and the immune system. *J Anat* 2003; 203: 1-19.
- 197] Verhein KC, Fryer AD, Jacoby DB. Neural control of airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2009; 9: 484-490.
- 198] Virchow C, Julius P, Lommatzsch M, Luttmann W, Renz H, Braun A. Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 2002-2005.

- 199] Wang Y, Bai C, Li K, Adler KB, Wang X. Role of airway epithelial cells in development of asthma and allergic rhinitis. *Respir Med* 2008; 102: 949-955.
- 200] Ware LB, Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L924-940.
- 201] Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, Holgate ST, Davies DE. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 2005; 201: 937-947.
- 202] Watanabe N, Hanabuchi S, Marloie-Provost MA, Antonenko S, Liu YJ, Soumelis V. Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. *Blood* 2005; 105: 4749-4751.
- 203] Wicks J, Haitchi HM, Holgate ST, Davies DE, Powell RM. Enhanced upregulation of smooth muscle related transcripts by TGF β 2 in asthmatic (myo)fibroblasts. *Thorax* 2006; 61: 313-319.
- 204] Wilde A, Beattie EC, Lem L, Riethof DA, Liu SH, Mobley WC, Soriano P, Brodsky FM. EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* 1999; 96: 677-687.
- 205] Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L525-534.
- 206] Windisch JM, Auer B, Marksteiner R, Lang ME, Schneider R. Specific neurotrophin binding to leucine-rich motif peptides of trkA and trkB. *FEBS Lett* 1995; 374: 125-129.
- 207] Wine JJ. Parasympathetic control of airway submucosal glands: central reflexes and the airway intrinsic nervous system. *Auton Neurosci* 2007; 133: 35-54.
- 208] Yamagata T, Ichinose M. Agents against cytokine synthesis or receptors. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 289-301.

- 209] Yamauchi K, Inoue H. Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling. *Allergol Int* 2007; 56: 321-329.
- 210] Yeiser EC, Rutkoski NJ, Naito A, Inoue J, Carter BD. Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in traf6^{-/-} mice. *J Neurosci* 2004; 24: 10521-10529.
- 211] York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ. Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8069-80683.
- 212] York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJ. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 1998; 393: 622-626.
- 213] Yuan J, Lipinski M, Degterev A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* 2003; 40: 401-413.
- 214] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407: 802-809.
- 215] Yung LY, Tso PH, Wu EH, Yu JC, Ip NY, Wong YH. Nerve growth factor-induced stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase in PC12 cells is partially mediated via G(i/o) proteins. *Cell Signal* 2008; 20: 1538-1544.
- 216] Zaccaro MC, Ivanisevic L, Perez P, Meakin SO, Saragovi HU. p75 Co-receptors regulate liganddependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276, 31023-31029.
- 217] Zampieri N, Chao MV. Mechanisms of neurotrophin receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 607-611.
- 218] Zhang D, Luo XR, Ye XQ, Dong XF. Determination of plasma and sputum substance P content in patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2005; 25: 1314-1315.
- 219] Zhang G, Lin RL, Wiggers ME, Lee LY. Sensitizing effects of chronic exposure and acute inhalation of ovalbumin aerosol on pulmonary C fibers in rats. *J Appl Physiol* 2008; 105: 128-138.

9 ANHANG

Abbildungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| Abb. 1: | Struktur der Neurotrophin-Monomere. → Seite 10 |
| Abb. 2: | Struktur eines NGF-Dimers. → Seite 11 |
| Abb. 3: | Interaktionen zwischen den Neurotrophinen und ihren Rezeptoren. → Seite 12 |
| Abb. 4: | Schematische Darstellung möglicher Dimerisationsformen von trkB-Monomeren im Rahmen der Neurotrophinbindung. → Seite 15 |
| Abb. 5: | Schematische Darstellung der Neurotrophinrezeptoren. → Seite 17 |
| Abb. 6: | Signaltransduktionswege über trk-Rezeptoren. → Seite 22 |
| Abb. 7: | Das Konzept der „neurogenen Entzündung“. → Seite 31 |
| Abb. 8: | Rolle der Neurotrophie in der Pathogenese des allergischen Asthmas. → Seite 34 |
| Abb. 9: | Rolle des TSLP als Vermittler zwischen aktiviertem Lungenepithel und T _H 2-vermittelter Immunantwort. → Seite 37 |
| Abb. 10: | Reparaturmechanismus des Lungenepithels. → Seite 40 |
| Abb. 11: | Konstitutive Sekretion von NGF und BDNF in LA-4 Zellen über einen Zeitraum von 6 Tagen. → Seite 56 |
| Abb. 12: | Polarität der Sekretion von BDNF a) bzw. NGF b) in LA-4 Zellen. → Seite 58 |
| Abb. 13: | Wachstumskinetik von LA-4 Zellen auf einer Fläche von 25 cm ² . → Seite 59 |
| Abb. 14: | a) kumulative Menge an sezerniertem NGF bzw. BDNF im Zellüberstand von LA-4 Zellpopulationen mit steigender Konfluenzdichte; b) von der einzelnen Zelle der jeweiligen Population sezernierte Menge an NGF bzw. BDNF. → Seite 61 |
| Abb. 15: | RT-PCR Analyse der Expression von NT und NTR in LA-4 Zellen aus prä-konfluenten Populationen und konfluenten Populationen. → Seite 63 |
| Abb. 16: | Dosisabhängige Inhibition der Proliferation von LA-4 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 50 bzw. 200nM des Tyrosinkinase-Inhibitors K252a. → Seite 66 |
| Abb. 17: | a) Proliferation von LA-4 Zellen unter Stimulation mit Neurotrophinen [CellTiter 96®AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay]. → Seite 69 b) Proliferation von LA-4 Zellen unter Stimulation mit Neurotrophinen [BrdU Cell Proliferation ELISA]. → Seite 70 |
| Abb. 18: | Proliferation von LA-4 Zellen in Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern gegen NGF bzw. BDNF. → Seite 72 |
| Abb. 19: | Sekretion von NGF a) und BDNF b) unter Stimulation mit Zytokinen. → Seite 74 |
| Abb. 20: | Sekretion von NGF a) und BDNF b) in Anwesenheit von Dexamethason. → Seite 77 |

Anmerkung

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in der nachfolgenden Veröffentlichung verwendet:

- Hahn C, Islamian AP, Renz H, Nockher WA. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 787-794.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

- | | | | |
|----------------|-------------|--------------|--------------|
| ▪ Adamkiewicz | ▪ Gerdes | ▪ Kroll | ▪ Renz |
| ▪ Arnold | ▪ Geus | ▪ Lang | ▪ Schmidt |
| ▪ Aumüller | ▪ Gotzen | ▪ Lill | ▪ Seitz |
| ▪ Barth | ▪ Griss | ▪ Maisch | ▪ Studer |
| ▪ Basler | ▪ Gudermann | ▪ Mandrek | ▪ Weihe |
| ▪ Baum | ▪ Hofmann | ▪ Moll | ▪ Werner |
| ▪ Becker | ▪ Jungclas | ▪ Müller | ▪ Westermann |
| ▪ Christiansen | ▪ Klenk | ▪ Mutters | ▪ Wulf |
| ▪ Eilers | ▪ Koolmann | ▪ Neubauer | |
| ▪ Fuchs | ▪ Krause | ▪ Oertel | |
| ▪ Feuser | ▪ Krieg | ▪ Remschmidt | |

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. H. Renz dafür, dass ich diese Arbeit im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg durchführen durfte.

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn PD Dr. A. Nockher für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit sowie seine engagierte Beratung und Unterstützung bei allen wissenschaftlichen und methodischen Problemen.

Nicht minder gebührt auch Herrn Dr. C. Hahn mein aufrichtiger Dank für seine kompetente Betreuung im Labor.

Ferner möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern des Labor-Teams für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken.

Schließlich möchte ich es an dieser Stelle nicht versäumen, meiner Familie meinen innigsten Dank auszusprechen, deren Mitglieder mich fortwährend in jeglicher Hinsicht vorbehaltlos unterstützt und motiviert haben, und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.